

**Expression des Mosaikgens
COB in mtDNA
von *Saccharomyces cerevisiae*:
Reifungsschritte der mRNA
und deren Abhängigkeit von
mitochondrial kodierten Proteinen**

**DISSERTATION
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Carlo Schmelzer**

München, Mai 1981

**Expression des Mosaikgens
COB in mtDNA
von *Saccharomyces cerevisiae*:
Reifungsschritte der mRNA
und deren Abhängigkeit von
mitochondrial kodierten Proteinen**

**DISSERTATION
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Carlo Schmelzer**

München, Mai 1981



1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. J. Schweyen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 7. 1981

INHALTSVERZEICHNIS

I. <u>Einleitung</u>	1	-	6
II. <u>Material und Methoden</u>	7	-	18
1. Stämme			
2. Medien und Puffer			8
3. Feinchemikalien			8
4. Abkürzungen und genetische Bezeichnungen			9
5. Methoden	10	-	18
5.1 Züchtung von Hefezellen und Isolation von Mitochondrien			10
5.2 Isolation und analytische Auftrennung von mtRNA			10
5.2.1 Gewinnung und Reinigung von mtRNA	10	-	11
5.2.2 Analytische Auftrennung und Molekulargewichtsbestimmung von mtRNA-Spezies durch Harnstoff- oder Quecksilber/Agarosegelelektrophorese			11
5.3 Isolation und Dichtegradientenzentrifugation von mtDNA			12
5.4 Restriktionsverdau, Gelelektrophorese und Isolierung von mtDNA-Fragmenten aus Agarosegelen	12		13
5.5 ³² P-Markierung von mtDNA durch "nick-translation"	13	-	14
5.6 Transfer von mtDNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter			14
5.7 Hybridisierung Nitrocellulose-gebundener DNA mit ³² P-mtDNA			15
5.8 Transfer von mtRNA aus Quecksilber/Agarosegelen auf DBM-Papier	15		16
5.9 Hybridisierung filtergebundener mtRNA mit ³² P-mtDNA			17
5.10 Cytochromspektren	17	-	18
III. <u>Ergebnisse</u>	19	-	79
1. Physikalische Kartierung von kodierenden und intervenierenden Sequenzen der COB-Region mittels Restriktionsanalyse von rho ⁻ -mtDNA	19	-	20

1.1 Organisation von rho ⁻ -mtDNA		21
1.2 Physikalische Kartierung von rho ⁻ -mtDNA durch Restriktionsanalyse	21	- 23
1.3 Erstellung einer physikalischen Karte der COB-Region durch Vergleich der Restriktionsanalyse von rho ⁻ -mtDNA mit genetischen Daten	24	- 36
2. Untersuchung von COB-Transkripten durch Gelelektrophorese und Hybridisierung filtergebundener mtRNA mit ³² P-mtDNA	37	- 38
2.1 Gelelektrophorese von WT-mtRNA und Hybridisierung mit ³² P-COB-mtDNA	38	- 47
2.2 Zusammensetzung der COB-Transkripte im Wildtyp/Excisionsreihenfolge von IVS	48	- 51
2.3 Hybridisierung von mtRNA aus mit ⁻ -Mutanten mit ³² P-COB-mtDNA		52
2.3.1 Hybridisierung von mtRNA aus mit ⁻ -Mutanten (IVS) mit ³² P-COB-mtDNA und IVS-spezifischer ³² P-mtDNA	53	- 59
2.3.2 Hybridisierung von mtRNA der cob ⁻ -Mutanten M4873 und M4942 mit verschiedenen IVS-spezifischen ³² P-mtDNA-Proben	59	- 62
2.3.3 Hybridisierung von mtRNA aus cob ⁻ -Mutanten der Exons mit ³² P-COB-mtDNA	62	- 65
2.4 Charakterisierung einer mit ⁻ -Mutante aus dem "leader"-Bereich der COB-Region: M9410		66
2.4.1 Genetische und physiologische Charakterisierung der Mutante M9410	66	- 67
2.4.2 Physikalische Charakterisierung der mtDNA von M9410 durch Restriktionsanalyse	67	- 68
2.4.3 Analyse der Transkripte durch Hybridisierung mit verschiedenen ³² P-mtDNA-Proben	69	- 71
2.5 Untersuchung des Einflusses von Chloramphenicol auf die Reifung der COB-mRNA		72
2.5.1 Einfluss der CAP-Inkubationsdauer auf die Blockierung der mRNA-Reifung des Wildtypstammes 777-3A	72	- 76

2.5.2	Einfluss von CAP auf das "Processing" der mRNA des Wildtypstammes D273-10B	77	-	79
IV.	<u>Diskussion</u>	80	-	96
V.	<u>Zusammenfassung</u>	97	-	98
VI.	<u>Literaturverzeichnis</u>	99	-	107





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548324_0009

I. EINLEITUNG

Untersuchungen über die Biogenese der Mitochondrien führten zur Entdeckung, dass diese ein eigenes Genom und einen Transkriptions- und Translationsapparat zur Expression ihrer Gene besitzen. Sie sind jedoch nicht voll-autonom: Von den schätzungsweise 200 verschiedenen Proteinen, die zum Aufbau eines funktionellen Mitochondriums notwendig sind, werden nur etwa zehn Prozent auf ihrem Genom kodiert. Diese stellen Untereinheiten zu grösseren Enzymkomplexen dar, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Die Mehrheit der Proteine wird im Cytoplasma gebildet und dann in die Mitochondrien eingeschleust (Borst, 1972; Schatz und Mason, 1974, Review; Borst und Grivell, 1978).

Die Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* enthalten ringförmig geschlossene, 25 µm lange DNA-Moleküle mit einem Molekulargewicht von 5×10^7 Dalton (≈ 75 kbp). Folgende Gene sind auf diesem Genom lokalisiert worden (siehe Abb. 1): OXI 1, OXI 2, OXI 3, kodierend für Untereinheit II, III und I der Cytochrom-c-Oxidase, COB, kodierend für Apocytochrom b, PHO 1/OLI 2 und PHO 2/ OLI 1, kodierend für Untereinheiten der Oligomycin-sensitiven ATPase, VAR, kodierend für ein Polypeptid, das mit der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen assoziiert ist, sowie Gene für die beiden ribosomalen RNAs (21S und 15S) und 23 Gene für tRNA-Moleküle. Mitochondriale ribosomale Proteine sowie die für DNA-Replikation, Transkription und Translation notwendigen Enzyme sind im Genom des Zellkerns kodiert (Mitochondria 1977; International Bari Conference 1976, 1980; Borst und Grivell, 1978).

Das Studium der Organisation und Expression des Genoms der Mitochondrien in *Saccharomyces* ist aus mehreren Gründen interessant: i) Es ist ein kleines Genom, und damit - im Gegensatz zum Genom des Zellkerns - leicht einer molekularen Untersuchung (z.B. Restriktionsanalyse) zugänglich, ii) das genetische System, das einige Charakteristika prokaryontischer Organisation aufweist (Borst, 1972), arbeitet innerhalb einer eukaryontischen Zelle, und iii) es bietet die Möglich-

keit, Zusammenhänge zwischen mitochondrialem und nuklearem Genom, also zwischen zwei (teil-)autonomen Systemen zu untersuchen. Hefe ist für derartige Studien besonders geeignet, da sie als fakultativ anaerober Organismus durch den Prozess der alkoholischen Gärung, also ohne funktionelle Mitochondrien, für ein rasches Wachstum ausreichend Energie zu gewinnen vermag. Damit bietet sich die Möglichkeit, Mutationen, die die mitochondriale Funktion stören und bei anderen Organismen letal wären, zu untersuchen: Trotz Punktmutationen, kleinerer oder grösserer Deletionen, die die mitochondriale Funktion stören, wird die mitochondriale DNA durch cytoplasmatische Enzyme weiterhin repliziert, transkribiert und - abhängig von der Art der Mutation - auch translatiert (Borst, 1972; Schatz und Mason, 1974).

Voraussetzung für ein Verständniss der mitochondrialen Genexpression sind Kenntnisse über die mitochondriale Transkription sowie die darauffolgenden Reifungsprozesse und Modifizierungen der Transkripte einschliesslich deren Translation. Die ersten Untersuchungen, die sich auf die Transkription bezogen, befassten sich daher mit der Isolierung und Kartierung von Transkripten. Nachdem Sanders et al. (1975) die 21S und 15S ribosomalen RNAs als die häufigsten stabilen RNA-Spezies auf dem mitochondrialen Genom lokalisierten, wurden bald darauf mehr als 20 Gene für verschiedene tRNA-Spezies gefunden und auf einer physikalischen Karte eingeordnet (Fukuhara et al., 1976; Van Ommen et al., 1977). Weitere Untersuchungen befassten sich mit dem Studium der mitochondrialen mRNAs. Diese waren zuerst fehlgeschlagen, da man als Kriterium für mRNAs ein poly-adenyliertes 3'-Ende ansah, wie es allgemein bei Eukaryonten und den Mitochondrien höherer Eukaryonten der Fall ist (Groot et al., 1974). mRNAs aus Hefemitochondrien scheinen jedoch, wenn überhaupt, nur eine sehr kurze Poly-A-Sequenz (15 - 20 b, Hendler et al., 1976) zu besitzen. Schliesslich gelang es Van Ommen und Mitarbeitern (1979) durch Gelfraktionierung und ³²P-Markierungen von mRNAs und darauffolgenden Hybridisierungsstudien mit mtDNA eine erste Transkriptionskarte für mtDNAs aus Hefe zu erstellen (Abb.1). Sie zeigt, dass in Mitochondrien des Stammes

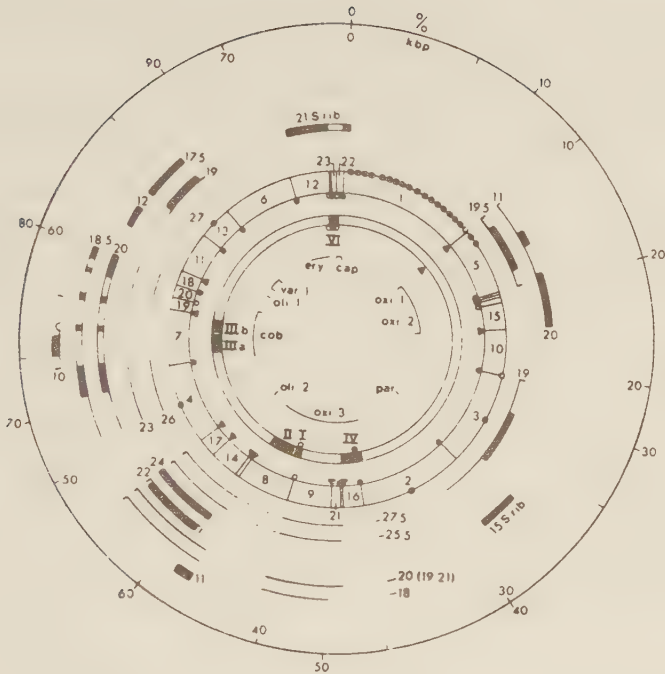


Abb. 1

Transkriptionskarte der mtDNA von KL 14-4A

Die Positionen der genetischen Loci sind im inneren Kreis dargestellt (cap: Chloramphenicolresistenz; OXI 1, OXI 2, OXI 3: Untereinheit 2, 3 und 1 der Cytochrom-c-Oxidase; par: Paromomycinresistenz; OLI 1, 2: Oligomycinresistenz; COB: Apocytochrom b; VAR: Genort eines polymorphen Proteins, das mit der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen assoziiert ist; ery: Erythromycinresistenz). Der darauffolgende Doppelkreis gibt die Restriktionskarte für EcoRI, HindII und HindIII wieder mit den aussen eingezeichneten Positionen für tRNA-Gene (●). Positionen und Längen von Transkripten sind durch schwarze Balken dargestellt. Offene Balken entsprechen den Positionen von IVS auf der mtDNA. In Fällen, in denen eine exakte Lokalisierung nicht möglich war, wird dies durch eine dünne Linie angegeben. Der äussere Kreis gibt die Kartenposition in kbp (bzw %) an (Vgl. Sanders et al., 1977). Nach Van Ommen et al., 1979.

KL 14-4A insgesamt ungefähr 25 unterschiedliche RNA-Spezies nachgewiesen werden können. Auffallend ist, dass i) die meisten dieser Transkripte wesentlich länger sind als es zur Synthese der entsprechenden Proteine auf Grund der Kodierungskapazität notwendig wäre und ii) Transkripte, die zwar unterschiedliche Längen besitzen, zum Teil mit den gleichen Regionen der mtDNA hybridisieren, d.h. gemeinsame Sequenzen enthalten. Wie man in Abb.1 sehen kann, ist dies bei dem Locus für OXI 3 der Fall, der für Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase kodiert (Slonimski und Tzagoloff, 1976) sowie bei dem Locus für COB, der für Apocytochrom b kodiert (Slonimski et al., 1978; Haid et al., 1979; Grivell et al., 1979; Kreike et al., 1979).

Diese Befunde deuten darauf hin, dass durch posttranskriptionelle Reifungsprozesse aus mRNA-Vorstufen mit wesentlich grösseren Molekulargewichten als für die Kodierung der entsprechenden Proteine nötig über verschiedene Zwischenstufen der fertige Messenger gebildet wird. Solches Processing von RNA ist typisch für Mosaik-Gene, also Gene, die intervenierende, in der reifen mRNA nicht mehr enthaltene Sequenzen (IVS) besitzen. Derartige Gene waren zuerst für rRNA (in *Drosophila*: Gloves et al., 1978), für tRNAs (in *Saccharomyces cerevisiae*, Kern-DNA: Goodman et al., 1977; Valenzuela et al., 1978) und für verschiedene Protein-kodierende Loci in höheren Eukaryonten und deren Viren gefunden worden (Vgl. Crick et al., 1979, Review). In Prokaryonten konnten sie bisher nicht nachgewiesen werden.

Um so erstaunlicher war die Entdeckung, dass Mitochondrien, deren Evolution aus dem prokaryontischen Bereich als wahrscheinlich gilt (Borst, 1972), offensichtlich Mosaik-Gene enthalten. Diese Organisationsform ist nachgewiesen für das Gen der 21S-rRNA, für OXI 3, kodierend für UE 1 der Cytochrom-c-Oxidase, und für COB, kodierend für Apocytochrom b (Heyting et al., 1979; Slonimski et al., 1978a; Van Ommen et al., 1979).

Organisation und Expression der COB-Region wurden mit besonderem Interesse studiert, da eine Vielzahl von Mutationen nicht nur in den

fünf Exons - den für Apocytochrom b kodierenden Bereichen - , sondern auch in den intervenierenden Sequenzen (IVS) bzw. den IVS/Exon-Randbereichen lokalisiert werden konnten. Das Studium ihrer Auswirkung auf die Synthese in COB kodierter Polypeptidsequenzen führte sehr bald zu der Vorstellung, dass Mutationen in IVS und deren Randbereichen die Reifung der mRNA für Apocytochrom b blockieren und dass an (hypothetischen) Vorläufer-RNA-Molekülen Translation von IVS-Sequenzen erfolgen kann (Kreike et al., 1979). Diese Befunde zur mutativen Störung der RNA-Reifung und zur Translation von IVS-Sequenzen sind bisher einmalig und machen die COB-Region zu einem besonders interessanten Objekt für Studien zur Expression von Mosaik-Genen, wie dies in der vorliegenden Arbeit versucht wird.

Ihr Ziel war die Analyse der Reifungsschritte, die zu einer Apocytochrom b kodierenden mRNA führen, sowie der möglichen Störung dieses Prozesses durch Mutationen in verschiedenen Sequenzen der COB-Region und durch Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese.

Ein wesentlicher Schlüssel zur Beantwortung dieser Fragen ist die Kenntnis der Längen und Zusammensetzung der mRNA-Vorstufen, die durch Hybridisierungsstudien von COB-mtRNA mit komplementären mtDNA-Sequenzen, die sich über definierte Teilbereiche der COB-Region erstrecken, ermittelt werden sollten. Die Gewinnung solcher spezifischer mtDNA-Proben setzt eine genaue physikalische Karte der COB-Region voraus, die es erlaubt, Aussagen über Positionen und Längen der auf Grund genetischer Daten als kodierend oder intervenierend definierten Bereiche machen zu können. Erst dadurch ermöglicht sich die Korrelation von genetischen Markern zu physikalischen Positionen.

Nachdem die bisherigen physikalischen Untersuchungen der mtDNA bzw. der COB-mtDNA noch keine ausreichende Auflösung boten (Sanders et al., 1977; Slonimski et al., 1978a; Hanson et al., 1979), war

die Erstellung einer genetisch/physikalischen Feinkarte der COB-Region als Vorarbeit erforderlich. Dies ist im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben: Eine genetisch/physikalische Feinkartierung dieser Region wurde mittels Restriktionsanalysen von ρ^- -Stämmen durchgeführt, die verschiedene Teilbereiche von durch mit⁻-Mutanten gekennzeichneten Positionen der COB-Region zurückbehalten hatten.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich dann mit der Analyse der Transkripte dieses Gens, um Aussagen über Mechanismen der post-transkriptionellen Reifung machen zu können. Methodische Grundbestandteile dazu waren gelelektrophoretische Auftrennung von mtRNA unter denaturierenden Bedingungen, Fixierung der mtRNA-Spezies auf DBM-Papier und Nachweis COB-spezifischer Transkripte durch Hybridisierung mit ³²P-COE-mtDNA. Transkripte des Wildtyps und einer Reihe von Mutanten, die innerhalb der fünf kodierenden oder in drei der vier intervenierenden Sequenzen lagen, wurden miteinander verglichen. Ausserdem wurde die unterschiedliche Zusammensetzung von mRNA-Zwischenstufen bestimmt, die im Wildtyp vorkommen und in einigen Mutanten akkumuliert werden. Da sich im Verlauf der Untersuchungen Hinweise darauf ergaben, dass mitochondriale Proteine an dem Reifungsprozess des Messengers beteiligt sind, befasst sich der abschliessende Teil der Arbeit mit Untersuchungen der RNA-Reifung unter Bedingungen, die die Translation an mitochondrialen Ribosomen blockieren.

Die hier gegebene Einführung in die allgemeinen Grundlagen der Thematik wird - zum besseren Verständnis - durch ausführliche Erläuterungen weitergeführt, die einzelnen Kapiteln vorausgehen.

Ergebnisse von Untersuchungen, die im gleichen Zeitraum von anderen Gruppen (vor allem Van Ommen, Amsterdam, und P. Slonimski, Paris) durchgeführt wurden und mit dem hier geschilderten Thema in Zusammenhang stehen, werden zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Stämme

Stamm	Kerngenotyp	mitochondrialer Genotyp	Herkunft
777-3A	α , adel, opl	rho ⁺	Kotylak et al., 1976
cob ⁻ -Mutanten mit Praefix M	α , adel, opl	rho ⁺ , cob ⁻ abgel. v. 777-3A	Schweyen et al., 1977; Bechmann et al., 1981
cob ⁻ -Mutanten mit Praefix G	α , adel, opl	rho ⁺ , cob ⁻ abgel. v. 777-3A	Kotylak et al., 1976
KL 14-4A	<u>a</u> , his1, trp2	rho ⁺ , cap ^r -321 oli ^r 1-1, par ^r -454	Wolf et al., 1973
rho ⁻ -Mutanten mit Praefix A oder B	<u>a</u> , his1, trp2	rho ⁻ , abgel. v. KL 14-4A	Slonimski et al., 1978; Mathews, Dissertation
rho ⁻ -Mutanten mit Praefix MM	<u>a</u> , his1, trp2	rho ⁻ , abgel. v. KL 14-4A	Mathews, Dissertation
RM 590-9D	<u>a</u> , trp1, tsp25	rho ⁺ , cap ^r -321 ery ^r -221, oli ^r 1-1 ana ^r -101, par ^r -454	Schweyen et al., 1977
BD4	<u>a</u> , trp1, tsp25	rho ⁻ , abgel. v. RM 590-9D	Schweyen et al., 1978
RM511-4A	<u>a</u> , ura3, trp1 tsp 25	ery ^r -221, oli ^r 2-1 par ^r -454	Schweyen et al., 1977
dD22	<u>a</u> , ura3, trp1 tsp 25	rho ⁻ , abgel. v. RM511-4A	Schweyen et al., 1978
D273-10B		rho ⁺	Sherman et al., 1968

Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme

2. Medien und Puffer

YD-Medium: Hefeextrakt 10g, Dextrose 30g, H₂O dest., ad 1 L

YG-Medium: Wie YD-Medium, anstelle von Dextrose jedoch 30g Glycerin.

YGal-Medium: Wie YD-Medium, anstelle von Dextrose jedoch 30g Galaktose.

Für die Herstellung von Platten wurde dem jeweiligen Medium 1.5% Agar zugegeben.

SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-citrat, pH 7.3

3. Feinchemikalien

Alle Chemikalien waren von dem höchsten verfügbaren Reinheitsgrad. Sie wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Agar	Difco, Detroit
Agarose	Seakem, Maine, U. S. A.
Bisbenzimid, H33258	Riedel de Haën, Hannover
BSA	Behring, Marburg
Caesiumchlorid	Baker, Deventer, Holland
CAP	Bayer, Leverkusen
DNA(aus Heringsperma)	Boehringer, Mannheim
DNApolymerase	Boehringer, Mannheim
EDTA	Sigma, St. Louis
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Hefeextrakt	Difco, Detroit
Methylquecksilber(II)-hydroxid	Ventron, Karlsruhe
Nitrocellulose	Schleicher und Schüll, Dassel
NBPC	BDH Ltd., Poole, England
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Radioaktive Substanzen	Amersham-Buchler, Braunschweig
Restriktionsenzyme	Bethesda, Rockville Maryland, U. S. A.
SDS	BDH Ltd., Poole, England
Sepharose G-50	Deutsche Pharmacia, Freiburg
TRIS	Sigma, St. Louis
tRNA aus E.coli	Boehringer, Mannheim
Zymolase 5000	Kirin Brewery Co. Ltd., Japan

4. Abkürzungen und genetische Bezeichnungen

ABM	Aminobenzylloximethyl
b	Basen
bp	Basenpaare
CAP	Chloramphenicol
cpm	Zerfälle pro Minute
dA(C, G, U)TP	Desoxiadenosin(cytidin-, guanosin-, uridin-)-5'-triphosphat
DBM	Diazobenzylloximethyl
DNA	Desoxiribonukleinsäure
cyDNA	cytoplasmatische DNA
mtDNA	mitochondriale DNA
E	Exon = kodierende Sequenz
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Äthylendiamintetraazetat
IVS	Intervenierende Sequenz
kb	Kilobasen
KD	Kilodalton
MG	Molekulargewicht
MHg-OH	Methylquecksilber(II)hydroxid
NBM	Nitrobenzylloximethyl
NBPC	NBM-pyridinchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
cyRNA	cytoplasmatische RNA
mtRNA	mitochondriale RNA
mRNA	Messenger-RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
TE	Tris-EDTA
TEB	Tris-EDTA-Borat

-
- ρ^+ mit⁺ : Wildtyp, WT
 mit⁻ : Punktmutation oder kurze Deletion der mtDNA, die zu
 Atmungsdefekten bei intaktem Translationssystem führen.
 ρ^- : Makrodeletionen in der mtDNA, die nicht nur zu Atmungs-
 defekten sondern auch zum Ausfall des Translationssystems
 führen.
 ρ^0 : vollständiger Verlust der mtDNA
 cap^r , ery^r , oli^r und par^r bezeichnen Mutationen in der mtDNA, die Re-
 sistenz gegen Chloramphenicol, Erythromycin, Oligomycin und
 Paromomycin bedingen.
 α/α : Paarungstyp
 his , trp , tsp und op bezeichnen Mutationen in der Kern-DNA

5. Methoden

5.1 Züchtung von Hefezellen und Isolation von Mitochondrien

Für DNA-Präparationen wurden die Hefezellen des verwendeten Wild-typs in YG-Medium, mit⁻- und rho⁻-Stämme in YD-Medium unter Schütteln bei 32°C bis zur frühen stationären Phase gezüchtet. Für RNA-Präparationen wurden alle Stämme in YGal-Medium zur Vermeidung des Glucose-Repressions-Effektes (Böker et al., 1976; Holzer, 1976) bei 32°C bis zu einem Titer von $2-5 \times 10^7$ Zellen/ml gezüchtet.

Zur Isolation von Mitochondrien wurde die Methode von Lang et al., (1977) angewandt. Die Zellen wurden in Sorbitolpuffer (0.6M Sorbitol, 2 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, pH 6.8) in Gegenwart von Glasperlen (ϕ 0.4mm) bis zu einer Ausbeute von 60-80 % aufgeschlossen. Bei einem Teil der Hefestämme wurden die Mitochondrien nach vorausgegangener Protoplastierung der Zellen mit Zymolase und β -Mercapto-äthanol gewonnen (Lewin et al., 1978). Durch wiederholtes Waschen und Zentrifugieren bei 20.000 rpm (4°C) wurden die Mitochondrien aus dem Zellaufschluss pelletiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

5.2 Isolation und analytische Auftrennung von mtRNA

5.2.1 Gewinnung und Reinigung von mtRNA

Präparationen von RNA aus gereinigten Mitochondrien erfolgten im Wesentlichen nach der Methode von Morimoto et al. (1979): Die Mitochondrien wurden mit 2 % SDS bei 4°C lysiert, die Nukleinsäuren anschliessend durch ein- bis zweimaliges Extrahieren mit Phenol von Proteinen befreit und zuletzt mit dem 25-fachen Volumen Äthanol (+ 0.2M Na-Acetat) bei -20°C präzipitiert. Wenn erforderlich, wurde die DNA aus dem Nukleinsäuregemisch mit DNase (Boehringer)

verdaut. 2-5 µg der Probe wurden in 10 mM MgCl₂, pH 7.0, mit 10 µg DNAase 30 min lang bei 25°C inkubiert, anschliessend mit Phenol extrahiert und mit Äthanol präzipitiert.

Reinigung der DNase von RNase-Kontamination: 5 mg DNase wurden in 1 ml 2.5 M HCl gelöst, über Nacht gegen 1 L 2.5 M HCl dialysiert (4°C) und nach Zugabe von 4 ml Jod-Azetat-Puffer (0.15 M, pH 5.3) 1 Stunde lang erhitzt (55°C). Das sich dabei bildende Präzipitat wurde abzentrifugiert, der Überstand auf einer Sepharose G-50 -Säule aufgetrennt. DNase enthaltende Fraktionen wurden durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm bestimmt, gesammelt und lyophilisiert (Zimmermann und Sandeen, 1966; Henikoff, 1977).

5.2.2 Analytische Auftrennung und Molekulargewichtsbestimmung von mtRNA-Spezies durch Harnstoff- oder Quecksilber/Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle auf Intaktheit bzw. Kontamination mit Protein oder cyrRNA wurde die mtRNA auf 1.5%igen, senkrechten Agaroseplatten-gelen (13 x 18 x 0.2 cm) die zur Denaturierung der RNA 6 M Harnstoff enthielten, aufgetrennt. Pro Geltasche wurden 1-5 µg RNA aufgetragen, je nach Bedarf wurden Gele mit 6 - 10 Taschen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte 4-5 h lang bei 150 V (4°C) in Phosphat-puffer (36 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, 40 mM TrisHCl, pH 7.4). Nach dem Lauf wurden die Gele mit EB-Lösung (1µg/ml) 30 min lang angefärbt und anschliessend im UV-Durchlicht mit einem "Durst-Laborator" fotografiert.

Für Hybridisierungsexperimente und Molekulargewichtsbestimmungen wurde die RNA auf 1.5%igen Agarosegelen, wie oben beschrieben, aufgetrennt. Diese enthielten jedoch anstelle von Harnstoff das stärkere Denaturierungsmittel Methylquecksilber(II)hydroxid (5 mM), (Bailey und Davidson, 1976), der Lauf erfolgte bei Raumtemperatur. Die Bestimmung der S-Werte bestimmter Transkripte und der entsprechenden Längen (in b) erfolgte durch Kalibrierung des Gels mit 15S mt-rRNA (1600 b) und 21S mt-rRNA (3200 b) als interne Standards (Tabak et al., 1979).

5.3 Isolation und Dichtegradientenzentrifugation von mtDNA

Das Äthanolpräzipitierte Nukleinsäuregemisch wurde bei 20.000 rpm abzentrifugiert und in TE-Puffer (10 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, pH 7.4) gelöst. Zur Entfernung von RNA und nichtmitochondrialer DNA wurde im NaJ- oder CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert. Für die NaJ-Gradientenzentrifugation wurde eine NaJ-Lösung mit einem Brechungsindex von 1.4295 mit 1 µg EB/ml verwendet. Für die CsCl-Gradientenzentrifugation wurde eine CsCl-Lösung von 1.59 g/cm³ ($\hat{=}$ 1.15 g CsCl auf 1 ml TE-Puffer) mit 1 µg Bisbenzimid (Müller und Gautier, 1975) hergestellt. Die Zentrifugation erfolgte bei 20°C zwei Tage lang (CsCl) bzw. vier Tage lang (NaJ) bei 40.000 rpm in 50-Ti- oder 60-Ti-Rotoren in Beckman Ultrazentrifugen L5-50.

Die im UV-Licht fluoreszierende mtDNA-Bande wurde mit einer Spritze seitlich dem Zentrifugenröhrchen entnommen und gegebenenfalls einer zweiten Zentrifugation unterworfen, z.B. wenn die Kontamination mit cyDNA noch stark war. Die Entfernung des EB erfolgte durch zweimaliges Ausschütteln mit Isoamylalkohol; Bisbenzimid wurde durch Isopropanol-Extraktion entfernt. Zum Entsalzen wurde anschliessend gegen 5 L TE-Puffer mit viermaligem Wechsel 48 Stunden bei Raumtemperatur dialysiert. Nach der Dialyse wurden zur Proteinentfernung 1-2 Phenolextraktionen durchgeführt, bei einem Teil der Präparationen mit einer vorausgegangenen Proteinase-K-Behandlung (100 µg/ml Proteinase K, 2 h bei 37°C). Anschliessend wurde die DNA mit Äthanol bei -20°C gefällt.

5.4 Restriktionsverdau, Gelelektrophorese und Isolierung von mtDNA-Fragmenten aus Agarosegelen.

Restriktionen wurden mit folgenden Enzymen durchgeführt: AluI, BamHI, EcoRI, HindII, HindIII, HinfI, HaeIII und HpaII. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Pro 1 µg DNA wurden 1-2 Units Restriktionsenzym zugesetzt. Restriktionspuffer wurden nach Angaben des Herstellers

verwendet. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben für den Elektrophoreselauf mit 1/3 Volumen Bromphenolblau-Lösung (10 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, pH 7.4, 0.7 % Bromphenolblau, Sucrose-gesättigt) versetzt.

Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in horizontalen 1.5%igen oder 0.7%igen Agaroseplattengelen (20 x 13 x 0.4 cm), die je nach Probenanzahl 1, 3, 6, 8 oder 12 Geltaschen hatten. Die Elektrophorese erfolgte in TEB-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, pH 8.3; Peacock und Dingmann, 1967) mit 1 µg/ml EB, sodass der Lauf unter UV-Licht beobachtet werden konnte. Spannung: 100-120 V, Dauer: 4-6 Stunden (Raumtemperatur). Die Fotografie der Gele erfolgte wie in Kap. 5.2.2 angegeben.

Isolierung von mtDNA-Fragmenten

Um Restriktionen mit weiteren Enzymen durchführen zu können oder zur Markierung mit ^{32}P wurden die mtDNA-Fragmente elektrophoretisch aus dem Gel extrahiert. Die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Banden wurden in einen kleinen Dialyseschlauch gegeben und in TE-Puffer (+ 1 µg/ml EB) im UV-Licht 30 min lang bei 100 Volt elektrophoretisiert. Danach wurde die DNA vorsichtig aus dem Dialyseschlauch entnommen und zur Entfernung von Ethidiumbromid mit 5 M NaCl (Endkonzentration: 1 M) gemischt und mit Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Anschliessend erfolgte eine Äthanol-fällung bei -20°C . Die Molekulargewichtsbestimmung der Restriktionsfragmente geschah durch Co-Elektrophorese von ϕX -174-DNA, gespalten mit HaeIII, bzw. P22-DNA, gespalten mit EcoRI (Jackson et al., 1978; Sanger et al., 1978).

5.5 ^{32}P -Markierung von mtDNA durch "nick-translation"

Die Markierung der mtDNA mit ^{32}P -Triphosphaten erfolgte nach der Methode von Rigby et al. (1977), jedoch ohne Zugabe von DNAase.

0.1 - 1.0 μg ρho^- -mtDNA bzw. Restriktionsfragmente von mtDNA wurden bei 18°C 2 1/2 Stunden lang in folgendem Gemisch inkubiert: 50 pM dAT³²P, 50 pM dCT³²P (spez. Aktivität 2.500 Ci/mMol) 500 pM dGTP, 500 pM dTTP
6 mM MgCl₂, 10 mM β -Mercaptoäthanol, 40 mM TrisHCl, pH 8.0
DNAPolymerase I: 1 Unit
Endvolumen des Inkubationsansatzes: 100 μl

Nach Beendigung der Inkubation mit 1/10 Volumen 0.5 M EDTA wurde der Einbau der radioaktiven Isotopen gemessen, der zwischen 20-60 % der eingesetzten Radioaktivität lag. Die Abtrennung der nicht-inkorporierten ³²P-Triphosphate aus dem Reaktionsgemisch erfolgte über eine Sepharose G-50-Säule (4 ml). Die gesammelten Fraktionen wurden bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren. Die Reinheit und Intaktheit der markierten mtDNA wurde auf Agarosegelen (vgl. Kap. 5.4) geprüft. Diese wurden nach dem Lauf getrocknet und radioautographiert. Die spezifische Aktivität der ³²P-mtDNA lag bei $2\text{-}8 \times 10^7$ cpm/ μg .

5.6 Transfer von mtDNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter

Die Übertragung erfolgte nach der Methode von Southern et al. (1975). Die gefärbten und fotografierten Gele wurden in 0.5 M NaOH 15 min lang zur Denaturierung der DNA geschüttelt, 20 min neutralisiert (0.5 M NaCl, 0.5 M TrisHCl, pH 5.0) und zuletzt mit 20 x SSC 20 min lang äquilibriert. Das Gel wurde auf 2 Lagen Whatman 3MM-Papier (getränkt mit 20 x SSC) gelegt und mit Nitrocellulosepapier (BA 85/20) bedeckt; auf dieses wurden zwei Schichten 3MM-Papier und eine 3-5 cm dicke Zellstoffschicht gelegt. Das Ganze wurde mit Glasplatten beschwert. In Abständen von 30 min wurde die feuchte Zellstoffschicht gegen eine trockene Schicht ausgetauscht; der Transfer wurde über Nacht bei 4°C fortgesetzt. Anschliessend wurde der Nitrocellulosefilter kurz in 2 x SSC gewaschen, getrocknet und bei 80°C 2 Stunden lang gebacken.

5.7 Hybridisierung Nitrocellulose-gebundener DNA mit ^{32}P -mtDNA

Vorinkubation der DNA-beladenen Nitrocellulose erfolgte bei 60°C 30 min lang in 3 x SSC, dann 30 min in Denhardt's Lösung (0.02 % Ficoll, 0.02 % BSA, 0.02 % Polyvinylpyrrolidon in 3 x SSC; Denhardt, 1966) und schliesslich 1 Stunde lang erneut in Denhardt's Lösung (mit zusätzlich 0.1 % SDS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ niedermolekulare, einzelsträngige Träger-DNA aus Heringsperma). Die Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht in 3-10 ml (je nach Grösse des Filterstreifens) Denhardt's Lösung in 3 x SSC und 10-30 ng radioaktive, hitzedenaturierte mtDNA. Zur Vermeidung von Verdunstung und um das Inkubationsvolumen gering zu halten wurde die Hybridisierung in zusammengeschweissten Plastikfolien durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Nitrocellulosestreifen zur Entfernung nicht- oder unspezifisch gebundener ^{32}P -mtDNA 6 mal jeweils 5 min lang in Denhardt's Lösung bei 60°C gewaschen, anschliessend 2 mal 15 min lang in 0.1 x SSC (+SDS und Träger-DNA, s.o.) geschüttelt. Der Streifen wurde getrocknet und bei -70°C mit einer CAWO-SE-6-Verstärkerfolie und KODAK X-Ray-O-Mat Film radioautographiert.

5.8 Transfer von mtRNA aus Quecksilber/Agarosegelen auf DBM-Papier

Die Übertragung und Fixierung der mtRNA auf Diazobenzylloximethylpapier (DBM) wurde nach der Vorschrift von Alwine et al. (1977) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass die RNA über ihre Basen mit den Diazogruppen des Papiers reagiert und kovalent an dieses gebunden wird.

Herstellung des Aminobenzylloximethyl-Papiers (ABM)

910 mg ((Nitrobenzylloxi)methyl)pyridindichlorid (NBPC) und 280 mg Natriumazetat, gelöst in 70%igem Äthanol (9 ml), wurden gleichmässig auf Whatman 540-Papier (18 x 27 cm) verteilt und bis zur Trockne eingerieben. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt (mit 100 % Äthanol, kein Natriumazetat), dann wurde das Papier bei 60°C

30 min lang getrocknet und sofort 35 min bei 130°C in einer Aluminiumfolie erhitzt. Nach zweimaligem Waschen mit H₂O (je 20 min) wurde erneut bei 60°C (2 1/2 Stunden) getrocknet und dann mit je 200 ml Benzol zweimal 30 min geschüttelt. Das getrocknete Papier wurde bis zum weiteren Gebrauch in Aluminiumfolie im Exsiccator bei 4°C aufbewahrt.

Aktivierung des Papiers

Die Umwandlung des ABM-Papiers in reaktionsfähiges DBM-Papier wurde erst kurz vor Gebrauch durchgeführt.

Das Papier wurde 30 min bei 60°C in 200 ml 20%igem Natriumdithionit geschüttelt, 20 min mit H₂O gewaschen, dann 20 min in 30%iger Essigsäure (200 ml) geschüttelt und erneut 3 mal mit je 200 ml H₂O gewaschen. Die Umwandlung der Aminobenzylloximethyl-Gruppen in Diazobenzylloximethyl-Gruppen erfolgte bei 4°C in folgender Lösung. 40 ml H₂O, 80 ml 1.8 M HCl, 3.2 ml NaNO₂-Lösung (10mg/ml) 30 min lang. Danach wurde 5 mal je 5 min mit 100 ml eiskaltem H₂O (Farbumschlag von weiss nach leuchtendgelb) und zweimal jeweils 5 min mit kaltem Phosphat-Puffer (25 mM Kaliumphosphat, pH 5.8) gewaschen. Bis zum Beginn des eigentlichen Transfers wurde das Papier in kaltem Phosphat-Puffer aufbewahrt.

Transfer der mtRNA

Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 4 mal je 20 min in 500 ml Puffer (10 mM TrisHCl, pH 7.3, 0.1 % β -Mercaptoäthanol, 1 μ g/ml EB) gefärbt und fotografiert. Nach Denaturierung der RNA in 50 mM NaOH (+ 0.1 % β -Mercaptoäthanol) dreimal je 10 min lang und darauffolgender Neutralisierung mit 0.2 M Phosphat-Puffer (Kaliumphosphat, pH 5.8, 7 mM Natriumjodoacetat; 2 x 15 min, je 200 ml) wurde zweimal 5 min mit 25 mM Kaliumphosphat-Puffer gewaschen. Der Transfer erfolgte wie bei der in Kap. 5.6 beschriebenen Methode, anstelle von 20 x SSC wurde jedoch 25 mM Kaliumphosphat-Puffer als Transfermedium verwendet und von Beginn an bei 4°C gearbeitet. Nach dem Transfer wurde das Papier in 5 x SSC (+ 50 μ g/ml E. coli tRNA, 0.1 % SDS) bei 4°C aufbewahrt.

5.9 Hybridisierung filtergebundener mtRNA mit ^{32}P -mtDNA

Die Vorinkubation erfolgte ca. 6 Stunden lang bei 37°C in 90 ml folgender Lösung:

- 33 % Formamid (deionisiert, nitrocellulosegefiltert)
- Denhardt's Lösung (in 6 x SSC)
- 1 % Glycin
- 1 mg/ml Heringsperma-DNA (ultraschall-behandelt und hitzedenaturiert)

Die Hybridisierung erfolgte in 3-10 ml (je nach Filtergrösse) des gleichen Gemisches, jedoch ohne Zusatz von Glycin. Dazu wurden 25 ng/ml einzelsträngige ^{32}P -mtDNA gegeben und bei 37°C unter leichtem Schütteln 16 - 20 Stunden lang in verschweissten Plastikfolien inkubiert. Nichthybridisierte bzw. unspezifisch gebundene ^{32}P -mtDNA wurde durch sechsmaliges Waschen in je 100 ml 2 x SSC, 33 % Formamid jeweils 40 min bei 37°C und anschliessendes sechsmaliges Waschen in je 100 ml 0.5 x SSC (je 20 min) entfernt. Die noch feuchten Filterstreifen wurden erneut in Plastikfolien eingeschweisst und bei 70°C mit einer CAWO-SE-6 Verstärkerfolie radioautographiert.

Entfernung hybridisierter ^{32}P -mtDNA

Um die Filterstreifen noch einmal für weitere Hybridisierungen mit anderen ^{32}P -mtDNA-Proben benutzen zu können, wurden nach erfolgter Radioautographie die ^{32}P -mtDNA-Hybride durch Waschen in 90 % Formamid, 2 x SSC (60°C , 2 Stunden) entfernt (Haid, persönliche Mitteilung).

5.10 Cytochromspektren

Diploide Zellen von Mutanten der COB-Region wurden nach vorausgegangener Kreuzung mit a RM 590-9D, ρ^0 , auf 3%igen YGal-Platten ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30°C bebrütet. Die Zellen wurden von der Platte abgekratzt, in 50%iges Glyzerin suspendiert und nach

Reduktion mit Dithionit in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Spektren wurden in einem modifizierten Spektrometer (Shimadzu-UV-210A) aufgenommen.

III. ERGEBNISSE

Die im 1. Teil der Arbeit durchgeführten Untersuchungen hatten im wesentlichen zwei Zielsetzungen: i) Verfeinerung der von G.Grosch (Dissertation, 1980) mittels Restriktionsanalysen erstellten physikalischen Karte der COB-Region, um deren Struktur, d.h. Positionen und Längen kodierender und intervenierender Sequenzen exakter bestimmen zu können, ii) Restriktionsanalysen von $IVS\alpha/\beta$, in der bisher nur eine Restriktionsstelle (BamHI, Sanders et al., 1977) bekannt war, mit dem Enzym AluI, um diesen Bereich physikalisch weiter unterteilen zu können.

An Hand dieser Analysen war es nun möglich, Restriktionsfragmente mit Sequenzen aus genau definierten Teilbereichen der COB-Region (z.B. $IVS\gamma/\delta$) zu bestimmen und zu isolieren. Damit erst war die Voraussetzung für die im 2. Teil der Arbeit beschriebenen Untersuchungen geschaffen, die den Reifungsprozess der mRNA der COB-Region zum Gegenstand hatten: mRNA aus Hefezellen des Wildtyps oder von Mutanten wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Filter überführt und mit verschiedenen spezifischen ^{32}P -mtDNA-Proben hybridisiert.

1. Physikalische Kartierung von kodierenden und intervenierenden Sequenzen der COB-Region mittels Restriktionsanalyse von ρ^- -mtDNA

Die Feinstrukturanalyse der COB-Region, die auf der zirkulären Karte der mtDNA des Stammes KL 14-4A (Sanders et al., 1977) ungefähr von Position 52 kbp bis 60 kbp reicht (Abb.2), wurde durch Restriktionsanalysen von mtDNA (siehe Kap. 1.1) aus insgesamt 16 ρ^- -Stämmen (Slonimski et al., 1978b; Bechmann et al., 1981) durchgeführt, die mehr oder weniger grosse Teile der COB-Region zurückbehalten hatten.

S.cerevisiae KL14-4A mtDNA

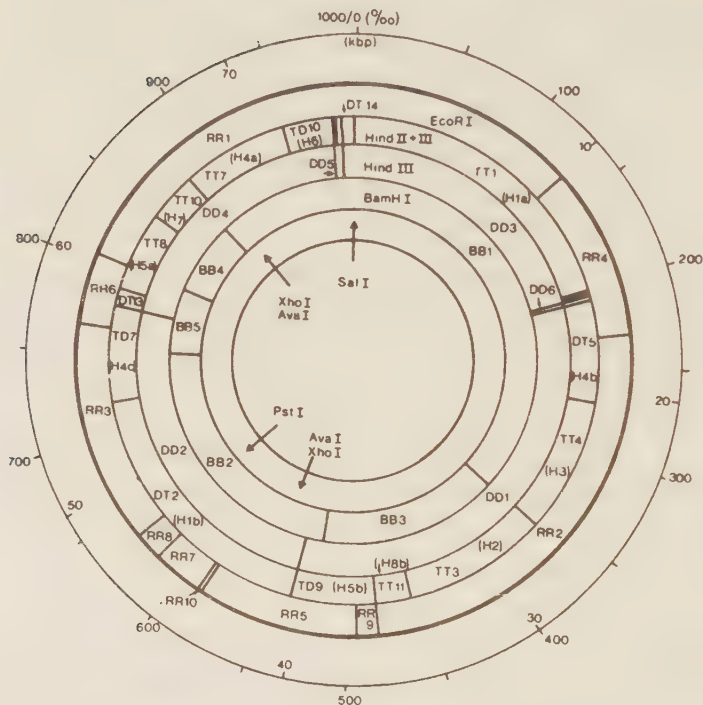


Abb.2

Zirkuläre Karte der mtDNA von KL 14-4A (Sanders et al., 1977)

Der äussere Kreis gibt die Kartenpositionen in kbp bzw. in Prozent an. Die inneren Kreise enthalten die Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme sowie deren Bezeichnung nach der Nomenklatur von Sanders et al. (1977). Folgende Fragmente enthalten COB-Sequenzen bzw. Teile davon: RR3, RR6, TD7, TT8, DT13, DD2, DD4, BB2, BB5. (Slonimski et al., 1978a; Grosch, Dissertation 1980)

1.1 Organisation von rho⁻-mtDNA

Unter rho⁻-Stämmen aus *Saccharomyces cerevisiae* versteht man Mutanten, die einen mehr oder weniger grossen Teil des Wildtypgenoms verloren haben. Sie entstehen nach Behandlung von Wildtypzellen mit MnCl₂ oder Ethidiumbromid aber auch spontan, jedoch mit geringerer Häufigkeit. Die zurückbehaltene Sequenz der mtDNA ist dabei reiteriert bis zur ursprünglichen Länge des Wildtypgenoms von 25 µm, liegt also in zahlreichen Kopien pro Molekül vor und ist genetisch stabil (Faye et al., 1973; Locker et al., 1974a, b). Es lassen sich zwei Reiterationstypen unterscheiden (Abb. 3A):

- i) "tandem"; die reiterierte Sequenz liegt in der gleichen Orientierung hintereinander vor (cdef- cdef- etc.; "head to tail"),
- ii) "palindrom"; die reiterierte Sequenz liegt in abwechselnder Orientierung vor (cdef-fedc-cdef-fedc, etc.; "head to head, tail to tail").

1.2 Physikalische Kartierung von rho⁻-mtDNA durch Restriktionsanalyse

Bei Restriktionsanalysen von rho⁻-mtDNA erhält man, je nach Länge der zurückbehaltenen Wildtypsequenz und Schnitthäufigkeit des verwendeten Enzyms, Restriktionsfragmente, wie man sie auch nach Restriktion des Wildtyps findet (Originalfragmente). Ausserdem entstehen zusätzlich neue Fragmente und damit in der Gelelektrophorese neue Banden. Diese sog. "junction"-Fragmente stammen aus dem Randbereich der mtDNA-Sequenz des rho⁻-Stammes, in dem Anfang und Ende der zurückbehaltenen Sequenzen durch die Reiteration verknüpft sind. Wie man in Abb. 3A sieht, entsteht bei einer "tandem"-Anordnung neben dem Originalfragment 1 "junction"-Fragment (J), bei einer "palindrom"-Anordnung entstehen jedoch 2 "junction"-Fragmente (J₁+J₂). Bei letzterer Anordnung entsprechen die "junction"-Fragmente der doppelten Länge der tatsächlich zurückbehaltenen Randsequenz. Die physikalische Länge der rho⁻-mtDNA-Sequenz ergibt sich aus der Addition der Wildtypfragmente und der "junction"-Fragmente, wobei

im Fall einer "palindrom"-Anordnung die addierten Molekulargewichte der beiden "junction"-Fragmente zu halbieren sind. Die Restriktion einer rho⁻-mtDNA mit verschiedenen Enzymen erlaubt jedoch nicht nur die Bestimmung ihrer Länge und des Reiterationstyps, sondern auch die Festlegung ihrer Lage innerhalb einer physikalischen Feinkarte der COB-Region auf Grund der von ihr zurückbehaltenen Originalfragmente, deren Lage innerhalb der Karte bekannt ist, und der Länge der "junction"-Fragmente. Die Konstruktion einer physikalischen Feinkarte der COB-Region mit Bestimmung ihrer Grenzen innerhalb der mtDNA, sowie der Lage und Grösse der für Apocytochrom b kodierenden Bereiche und IVS, ergibt sich aus dem Vergleich der genetischen Daten mit den physikalischen der einzelnen rho⁻-Stämme (Abb. 3B). Diese Karte gibt reale Entfernungen in bp von genetischen Markern an, im Gegensatz zu den durch Rekombinationsanalysen erhaltenen relativen Abständen (gemessen in % Rekombinationshäufigkeit).

An Hand eines kurzen Beispiels in Abb. 3B sei dies erläutert: rho⁻1 hat die genetischen Marker von α bis γ zurückbehalten, rho⁻2 hat die genetischen Marker von γ bis ϵ zurückbehalten. Auf Grund der Restriktionsanalyse ist ihre Lage innerhalb der physikalischen Karte der mtDNA bekannt (schwarze Balken). Da beide rho⁻-Stämme nur die genetischen Marker für γ gemeinsam haben, kann γ nur im Überlappungsbereich der mtDNA-Sequenzen dieser rho⁻-Stämme liegen. Einschränkend muss gesagt werden, dass es neben den in Abb. 3 dargestellten rho⁻-mtDNAs auch solche gibt, die nicht "ideal" sind. Das heisst, durch interne Deletionen, Duplikationen oder Inversionen, die im genetischen Test nicht immer erkannt werden, durch sich innerhalb eines Moleküls abwechselnde "tandem"- oder "palindrom"-Anordnungen und durch Verunreinigung von rho⁻-Stämmen mit kürzeren, spontan auftretenden Subklonen entstehen Restriktionsmuster, die kaum oder nur schwer interpretierbar sind. Diese scheiden für eine Analyse aus.

rho ⁻ mutante	reite- ration	EcoRI		BamHI		HindII		HindIII		HaeIII		HpaII		Länge (bp)
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
dD22*	tandem	6	7.000	5	5.275	5	6.375	0	10.600	1- 10	n.d.	1- 11	n.d.	10.600
E11A1	palind.	0	500+ 1.600	0	8.50+ 1.200	-	-	-	-	0	350+ 1.800	6	150 (2x)	1.050
E11	tandem	0	1.870	0	1.870	-	-	-	-	4	1.050	5a 6 7	175	1.870
A11	tandem	0	3.500	-	-	0	3.500	0	3.500	3 4 8	675	3 5a 9	1.200	3.500
MM1A9	palind.	-	-	-	-	0	400+ 1.500	-	-	0	950+ 1.050	0	850+ 1.150	980
MM1A11*	tandem	-	-	-	-	0	780	-	-	0	780	0	780	780
i111	tandem	0	3.700	-	-	0	3.700	0	3.700	7 8	1.400	2 3 9	1.400	3.700
i121A1	tandem	-	-	-	-	-	-	0	1.100	0	1.100	9	700	1.100
i121	tandem	0	2.600	-	-	-	-	0	2.600	8 7	1.300	2 9	1.400	2.750
BD4*	palind.	0	3.700 (2x)	0	150+ 7.150	-	-	0	1.100+ 6.250	8 7	2.350 (2x)	2 9	1.700+ 2.350	3.700
G231	tandem	0	2.750	0	2.750	-	-	-	-	0	2.750	0	2.750	2.750
B111*	palind.	-	-	0	150+ 2.700	-	-	-	-	-	-	-	-	1.350
P23	tandem	-	-	0	600	-	-	-	-	-	-	-	-	1.900 ^a
P25R1	palind.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.850 ^a
P31	tandem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	710 ^a
P26	tandem	-	-	0	3.100	0	3.100	-	-	0	3.100	0	3.100	3.100

Tabelle 1

Ergebnisse der Restriktionsanalysen von 16 rho⁻-mtDNAs

Spalte a: Die von dem jeweiligen rho⁻-Stamm zurückbehaltenen Wildtypfragmente (Zur Bezeichnung vgl. Abb.4).

Spalte b: Länge der "junction"-Fragmente; n.d.: nicht getestet

Die letzte Spalte gibt die Gesamtlänge der rho⁻-mtDNA an

^a) Bestimmung der Fragment-Längen durch Restriktionsanalyse mit AluI (vgl. Tab.2).

^b) Restriktionskartierung wurde von G.Grosch durchgeführt (Grosch, Dissertation 1980)

Von diesen 10 Fragmenten liegen 4 innerhalb des Überlappungsbereiches des BamHI-Fragmentes Nr.2 und des HaeIII-Fragmentes Nr.1 (vgl. Abb.4; nachgewiesen durch DNA/DNA-Hybridisierung, Daten nicht gezeigt). Verschiedene Kombinationen von AluI-Wildtypfragmenten, die in sich überlappenden rho⁻-mtDNA-Sequenzen entdeckt wurden, machten es möglich, deren Reihenfolge festzulegen (Tab.2).

Ein weiterer Beweis für die Reihenfolge der AluI-Fragmente ergab sich durch Hybridisierungsstudien: Das HaeIII-Fragment Nr.1 wurde mit AluI erneut geschnitten, nach Elektrophorese auf Nitrocellulosefilter überführt und mit verschiedenen ³²P-mtDNAs von überlappenden rho⁻-Stämmen hybridisiert ("Southern-Blot"; Abb.5, vgl. auch genetische Daten in Abb.6). Der Vergleich der Hybridisierungsdaten mit den in Abb.6 gezeigten genetischen Daten und den Restriktionsdaten aus Tabelle 2 erlaubt es, die Reihenfolge für die AluI-Fragmente zu bestimmen:

Da nur rho⁻ G231 mit dem Fragment Nr.7 (690 bp) hybridisiert, muss dieses am rechten Teil aussen liegen. Das AluI-Fragment Nr.1 (1600 bp) wird mit HaeIII geschnitten und es entsteht ein 1150 bp langes Fragment, mit dem rho⁻ G231 ebenfalls hybridisiert (Abb.5, Spur e). Auf AluI-Fragment Nr.7 folgt Fragment Nr.10 (210 bp), das mit rho⁻ P23 und P31 hybridisiert (Abb.5, Spur c,d). An dieses schliesst sich Fragment Nr.9 (450 bp) an, das mit rho⁻ P31 stark, mit rho⁻ P23 nur schwach hybridisiert. Schliesslich folgt darauf Fragment Nr.6 (750 bp), das nur mit rho⁻ P23 hybridisiert (Abb.5, Spur c).

Die Reihenfolge der AluI-Fragmente ist somit (in Richtung $\alpha \rightarrow \beta$):

Nr.6 (750 bp)-Nr.9 (450 bp)-Nr.10 (210 bp)-Nr.7 (690 bp)

Fragment Nr.9 (450 bp) konnte in rho⁻ B111 nicht entdeckt werden, obwohl dies zu erwarten war, da B111 mit BamHI geschnitten wird (Vgl. Tab.1). Vermutlich hat B111 durch eine genetisch nicht erkennbare Mutation die betreffende Schnittstelle für AluI verloren.

mtDNA von:	Nummer (vgl. Abb. 4) und Länge der AluI-Fragmente										Länge der "junctions"
	Nr. 6 bp	750	9 450	10 210	7 690	1 1600	2 1500	3 1300	4 1100	5 890	8) 560
A		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B		+	+	+	+	+					
C		+	+	+	+						
rho ⁻ P26		+	+	+	+						1.000
rho ⁻ P23			+	+	+						550
rho ⁻ P25R1			+	+	+						190+810
rho ⁻ B111				+	-*						900+1.400
rho ⁻ P31				+							500
rho ⁻ G231						+					1.000

Tab. 2

Anordnung und Fragment-Längen von AluI-Fragmenten in α , IVS α/β und β .

() = Reihenfolge wurde nicht bestimmt

A mtDNA von KL 14-4A, verdaut mit AluI und hybridisiert mit ³²P-mtDNA des HindII-Fragmentes Nr.5 und BamHI-Fragmentes Nr.5 ("Southern-Blot").

B mtDNA von KL 14-4A, verdaut mit AluI und hybridisiert mit ³²P-mtDNA von rho⁻ P32.

C Das überlappende Fragment von BamHI Nr.2 und HaeIII Nr.1 (Doppelverdau) wurde isoliert und mit AluI erneut verdaut.

*) Fragment AluI Nr.7 wurde nicht entdeckt, obwohl rho⁻ B111 auf Grund genetischer Analysen sich über diese Region hinaus erstreckt (vgl. Text).

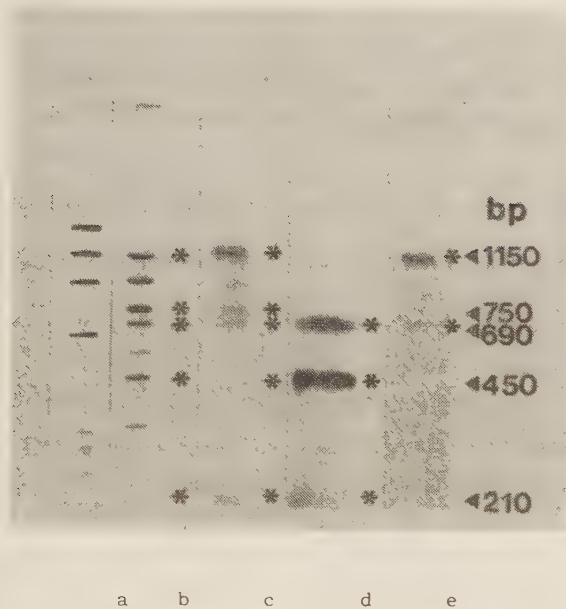


Abb. 5

AluI-Verdau des HaeIII-Fragmentes Nr.1 und Hybridisierung mit verschiedenen ³²P-mtDNA-Proben.

a) Eichmarker: ϕ X 174, geschnitten mit HaeIII .

b) Auftrennung der AluI-Fragmente in einem 1.5%igen Agarosegel, gefärbt mit EB.

c-e) Radioautographien

Hybridisierung von verschiedenen rho⁻-³²P-mtDNAs mit dem AluI-geschnittenen HaeIII-Fragment Nr.1 aus Spur b ("Southern-Blot").

c: rho⁻ P23, d: rho⁻ P31, e: rho⁻ G231

Die Lage des AluI-Fragmentes Nr.1 (1600 bp) ergibt sich durch die Restriktionsanalyse von ρ^- G231: Es muss auf Fragment Nr.7 folgen. Die anderen AluI-Fragmente sind nicht geordnet, da es sich für weitere Untersuchungen nicht als notwendig erwies. Die Ergebnisse der AluI-Restriktionsanalysen zusammen mit denen anderer Enzyme sind in Abb.5 und Tab.2 dargestellt.

Genetisch/physikalische Feinstrukturkarte der COB-Region von KL 14-4A

Durch Vergleich der in den Tabellen 1 und 2 gezeigten Ergebnisse der Restriktionsanalysen mit der physikalischen Karte der COB-Region konnten die Positionen und Längen der von den einzelnen ρ^- -Stämmen zurückbehaltenen mtDNA-Sequenzen in die Karte eingetragen werden. Dies ist in Abb.7 dargestellt. Die Korrelation dieser Daten mit den genetischen Daten, d.h. mit den genetischen Markern, die die ρ^- -Stämme zurückbehalten hatten (Abb.6), erlaubte die Konstruktion der genetisch/physikalischen Feinkarte, wie sie in Abb.7 ebenfalls dargestellt ist. Die Retention genetischer Marker und ihre Zuordnung zu IVS oder Apocytochrom b kodierenden Sequenzen entsprechen der Analyse von Bechmann et al.(1981). Der Abstand der in Transkriptionsrichtung am Anfang liegenden kodierenden Sequenzen α und β kann auf Grund der Länge von ρ^- -mtDNA von P25R1 mit mindestens 1850 bp bestimmt werden, da P25R1 zwar fast alle genetischen Marker der IVS α/β , jedoch keine der Sequenzen α oder β trägt. Der Beginn von α kann nicht genau festgelegt werden, da die einzigen Ergebnisse hier von ρ^- P26 kommen, der mit Ausnahme der beiden äussersten Gruppen (M4205, M591) zwar alle Marker der Sequenz α hat, dessen physikalische Lage jedoch auf Grund seiner "tandem"-Organisation nicht genau definiert ist. Dagegen ist die Bestimmung von β wesentlich besser möglich: Sie ergibt sich aus der Überlappung der mtDNA-Sequenzen der beiden ρ^- B111 und Bd4 (beide besitzen noch die genetischen Marker für Exon β), sowie durch P25R1, der keine Marker mehr der Sequenz β hat. Ihre Länge kann daher höchstens 100 bp betragen.

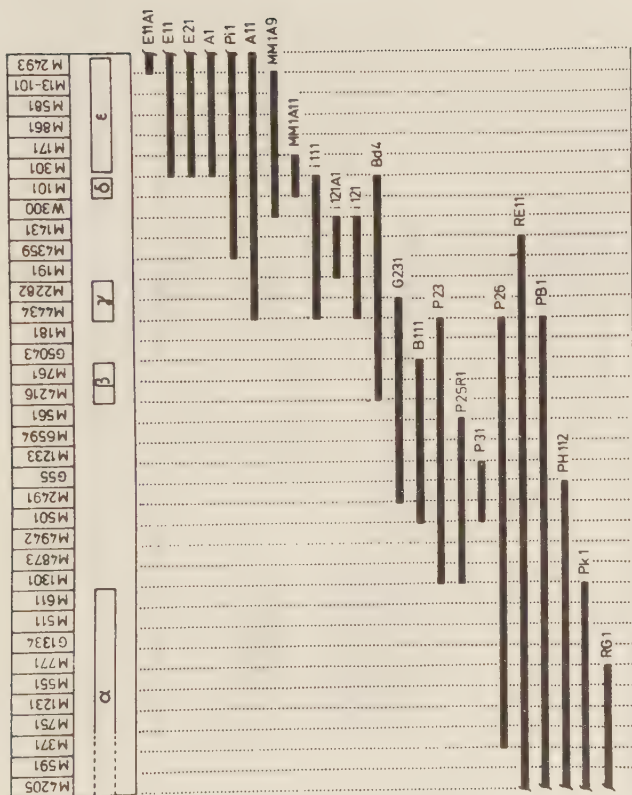


Abb. 6 Genetische Karte der COB-Region

Der obere Teil zeigt die Unterteilung der COB-Region in 37 genetische Gruppen, jeweils durch einen mit -Stamm (M... bzw. G...) repräsentiert, sowie die Lage der kodierenden und intervenierenden Sequenzen (Bechmann et al., 1981). Im unteren Teil sind die von den untersuchten rho'-Stämmen zurückbehaltenen genetischen Marker als schwarze Balken dargestellt (Slonimski et al., 1978; Bechmann et al., 1981; Schweyen, persönliche Mitteilung).

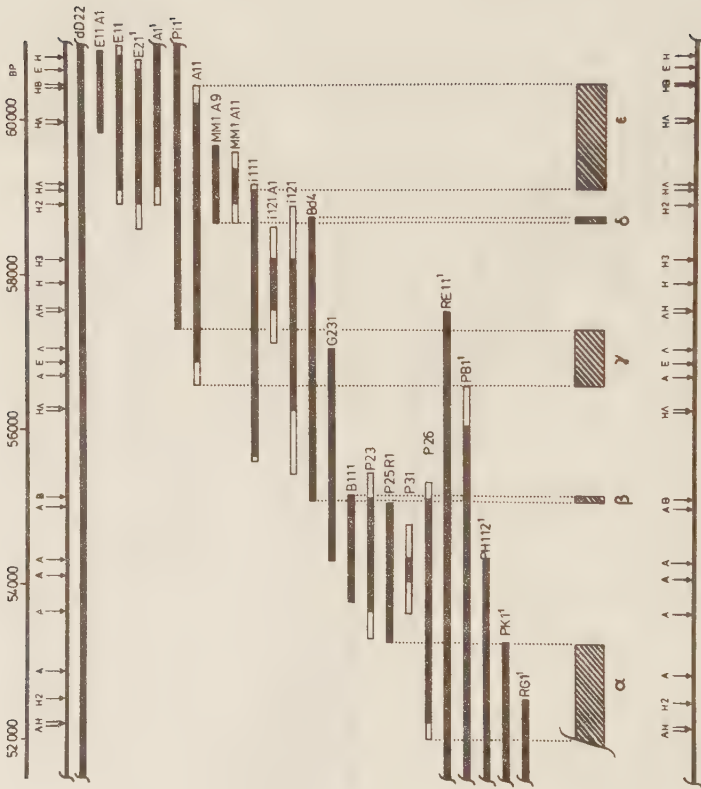


Abb. 7 Genetisch/physikalische Feinstrukturkarte der COB-Region, Lage der mtDNA-Sequenzen von verschiedenen rho⁻-Stämmen und Eingrenzung der kodierenden und intervenierenden Sequenzen (Text umseitig).

Abb. 6

Genetisch/physikalische Feinstrukturkarte der COB-Region, Lage der mtDNA-Sequenzen von verschiedenen rho⁻-Stämmen und Eingrenzung der kodierenden und intervenierenden Sequenzen.

Die Schnittstellen für die einzelnen Restriktionsenzyme sind oben und unten angegeben (↓, A ≙ AluI, A ≙ HaeIII, B ≙ BamHI, E ≙ EcoRI, H2 ≙ HindII, H3 ≙ HindIII, H ≙ HpaII). Waagrechte Balken repräsentieren Positionen und Längen der mtDNA-Sequenzen, die von rho⁻-Stämmen zurückbehalten wurden in Relation zur physikalischen Karte (schwarz = Mindestlänge, weiss = Maximallänge). Die schraffierten Bereiche α, β, γ, δ, ε bezeichnen die Maximalausdehnung der für Apocytochrom b kodierenden Sequenzen (Exons).

Die Positionen und Längen der rho⁻-mtDNA-Sequenzen wurden bestimmt durch: i) zurückbehaltene Wildtypfragmente und ii) Bestimmung der Länge (in bp) der zusätzlichen "junction"-Fragmente, wobei im Fall einer "tandem"-Anordnung die entstehenden zwei Randsequenzen, die das "junction"-Fragment bilden, nicht exakt bestimmt werden konnten (leere Balken; vgl. Text und Tab.1 und 2).

Im Fall einer "palindrom"-Anordnung sind die Randsequenzen genau festgelegt: Sie ergeben sich aus den halbierten Längen der beiden "junction"-Fragmente. Die Bestimmung, welches der "junction"-Fragmente sich an das linke bzw. rechte Ende der Wildtypsequenz anschliesst, erfolgt durch Vergleich der Daten aus Restriktionsanalysen mit verschiedenen Enzymen, der nur eine der beiden Anordnungsmöglichkeiten zulässt.

Bei rho⁻ G231-mtDNA ("tandem") entspricht der Abstand der äussersten linken (AluI) zur äussersten rechten Schnittstelle (HaeIII) der Gesamtlänge der von ihm zurückbehaltenen mtDNA-Sequenz, womit deren Position ebenfalls eindeutig definiert ist.

Auf die Kennzeichnung des Unsicherheitsbereiches einer rho⁻-mtDNA-Sequenz (leere Balken) wurde verzichtet, wenn dieser unter 50 bp lag.

¹) bezeichnen rho⁻-Stämme, die ausserdem von Slonimski et al. (1978a) bestimmt wurden und deren Schnittstellen für HpaII und AluI in dieser Arbeit nicht bestimmt wurden. Ein Teil der übrigen Restriktionsanalysen wurde in Zusammenarbeit mit Dr.G.Grosch durchgeführt.

Die Lage von Exon γ ist festgelegt durch ρ^- A11, der alle in γ liegenden Marker zurückbehalten hat und P11, der zwar alle Marker der Sequenz γ/δ mit Ausnahme des äussersten linken, jedoch keine γ -Marker zurückbehalten hat. Diese Lage wird weiterhin durch G231 bestimmt, der von $\text{IVS } \alpha/\beta$ kommend in γ hineinragt, d.h. nach genetischer Kartierung innerhalb von γ endet.

Exon δ ist definiert durch den Überlappungsbereich von ρ^- MM1A9 und Bd4, die beide noch alle genetischen Marker der Sequenz δ haben.

Mindestens 350 bp davon entfernt ist Exon ϵ , was durch die Lage von ρ^- i111 anschaulich wird, der zwar alle δ -Marker, jedoch keine ϵ -Marker zurückbehalten hat. Sehr wahrscheinlich ist ϵ jedoch noch weiter als 350 bp von δ entfernt, da ρ^- MM1A9 nur die äusserste linke Markergruppe der Sequenz ϵ zurückbehalten hat, was ungefähr der physikalischen Länge von 60 bp entspricht (Bechmann et al., 1981). Die (maximale) Länge von $\text{IVS } \delta/\epsilon$ würde somit 700 bp betragen. Das linke Ende von ϵ ist definiert durch ρ^- i111, der keine ϵ -Marker besitzt; das rechte Ende von ϵ und damit des kodierenden Teils der COB-Region ist durch ρ^- A11 festgelegt, der alle Marker von ϵ zurückbehalten hat.

Auf Grund dieser Daten kann man die Mindestlängen der IVS und die daraus resultierenden Maximallängen der kodierenden Bereiche von COB wie folgt festlegen:

IVS α/β : mindestens 1900 bp	α : maximal 1200 bp
IVS β/γ : mindestens 1400 bp	β : maximal 200 bp
IVS γ/δ : mindestens 1400 bp	γ : maximal 700 bp
IVS δ/ϵ : mindestens 350 bp	δ : maximal 200 bp
	ϵ : maximal 1000 bp

Genauere Angaben sind, bedingt durch die angewandte Methodik und der dadurch bedingten Grenzen an Genauigkeit, nicht möglich. Sie sollten sich jedoch vor allem für die im 2. Teil der Arbeit durchgeführten Untersuchungen der COB-Transkripte als völlig ausreichend erweisen.

Die hier gezeigten Daten lassen auch Rückschlüsse über die Verteilung der Mutationsorte innerhalb der einzelnen IVS zu, insbesondere in IVS α/β und IVS β/γ (Abb.8). Wie man in Abb.8 erkennen kann, können die Mutationsorte, die an Hand der Analysen von Bechmann et al. (1981) in IVS α/β kartiert sind, in 5 Gruppen zusammengefasst werden. M6594 und M561 liegen sehr nahe an β : Da sowohl ρ^- P31 als auch Bd4 diese Marker nicht mehr zurückbehalten haben, müssen sie zwischen dem linken Ende von Bd4 und dem rechten Ende von P31 liegen. Diese Nähe zu Exon β bestätigt genetische Untersuchungen (Bechmann et al., 1981). Die anderen Mutationsorte dürften über die gesamte IVS verteilt liegen.

in IVS β/γ liegen interessanterweise alle Mutationen sehr dicht an β , nicht weiter als maximal 300 bp entfernt (festgelegt durch ρ^- P23, i111 und P26), wie bereits an Hand genetischer Analysen angenommen werden konnte (Bechmann et al., 1981).

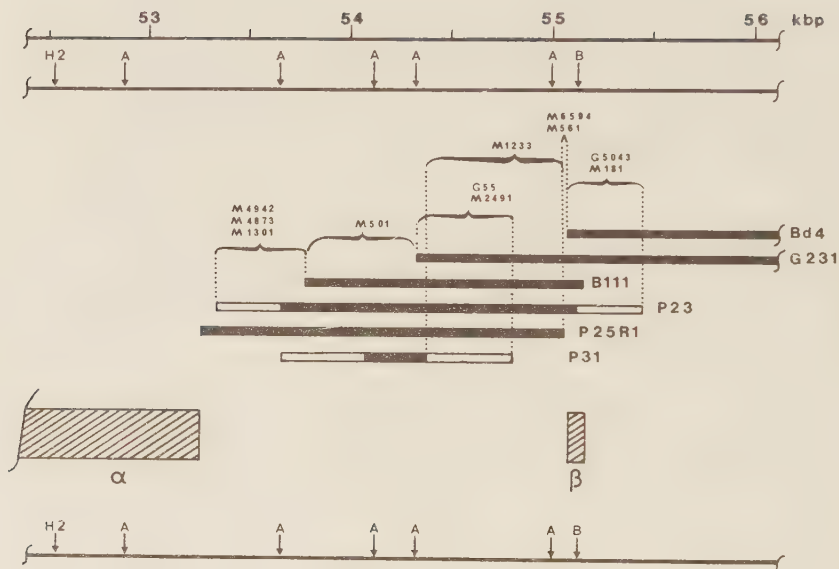


Abb. 8

Genetisch/physikalische Feinkarte von IVS α/β , β und IVS β/γ
 Die Bezeichnungen entsprechen den in Abb.7 angegebenen. Die Balken bezeichnen Mindestlängen (schwarz) bzw. Maximallängen (leer) von rho⁻-mtDNA-Sequenzen. Klammern bezeichnen den Bereich, in dem die jeweiligen genetischen Marker lokalisiert sein müssen (vgl. Abb.6).

2. Untersuchung von COB-Transkripten durch Gelelektrophorese und Hybridisierung filtergebundener mtRNA mit 32 P-mtDNA

Sowohl genetische als auch biochemische Untersuchungen hatten gezeigt, dass die für Apocytochrom b kodierende COB-Region ein Mosaikgen ist, in dem kodierende Sequenzen durch lange intervenierende Sequenzen (IVS) unterbrochen sind (Slonimski und Tzagoloff, 1976; Mahler et al., 1978; Slonimski et al., 1978a; Haid et al., 1979; Alexander et al., 1979). Mutationen in kodierenden und intervenierenden Sequenzen blockieren die korrekte Synthese von Apocytochrom b. Fünf kodierende Sequenzen (α , β , γ , δ , ϵ), unterbrochen von insgesamt vier IVS (IVS α/β , β/γ , γ/δ , δ/ϵ) unterschiedlicher Länge, wurden entdeckt (Kreike et al., 1979; Bechmann et al., 1981; Grosch et al., 1981) und deren Positionen und Längen auf einer physikalischen Karte bestimmt (Grosch et al., 1981; Teil 1 dieser Arbeit).

Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Frage, nach welchen Regeln Transkription und Translation dieses Gens erfolgen, die schliesslich zum funktionellen Apocytochrom b mit einem Molekulargewicht von 30 KD führen. Systematische Analysen der Transkripte der gesamten mtDNA (Van Ommen et al., 1979) führten im Bereich der COB-Region zur Entdeckung einer 18S-mRNA, was einer Länge von 2200 b entspricht, neben weiteren höhermolekularen Transkripten. Vermutungen, dass es sich bei der 18S-mRNA um den funktionellen Messenger von COB handelt, wurden durch EM-Hybridisierungsstudien zwischen COB-mtDNA und 18S-mRNA (Grivell et al., 1979) sowie der Analyse von in-vitro-Translationsprodukten der 18S-mRNA (Grivell et al., 1980) bekräftigt. Da die mtDNA der COB-Region eine Gesamtlänge von über 8000 bp besitzt - gegenüber der Länge von 2200 bp für 18S-RNA - richtete sich das weitere Hauptinteresse darauf, nach welchen Mechanismen die Reifung einer mRNA-Vorstufe zu dem funktionellen Messenger (18S-RNA) erfolgt. Wird - in Analogie zu Mosaikgenen des Kerns bei Eukaryonten - diese Reifung über stufenweise Verkürzungen des Primärtranskriptes durch Excision einzelner IVS erreicht, so sollte es möglich sein,

die dabei auftretenden, unterschiedlich langen RNA-Zwischenstufen mittels geeigneter Methoden nachzuweisen.

Der 2. Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung dieser Frage. Dazu wurden mtRNAs des Wildtyps und verschiedener cob^- -Mutanten gelelektrophoretisch getrennt und nach Übertragung auf Filter mit COB-spezifischen Sequenzen durch Hybridisierung identifiziert.

2.1 Gelelektrophorese von WT-mtRNA und Hybridisierung mit ^{32}P -COB-mtDNA

Bei der Agarosegelelektrophorese erfolgt die Auftrennung der verschiedenen Transkripte fast ausschliesslich nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht, falls die Moleküle in annähernd linearer Form vorliegen. Bei Elektrophorese von einzelsträngigen RNA-Molekülen mit mehr oder weniger starker Sekundärstruktur, bedingt durch partielle Rückfaltungen, ist es Voraussetzung, diese Sekundärstruktur aufzuheben, um genaue Molekulargewichtsbestimmungen durchführen zu können. Dafür eignen sich denaturierende Agentien wie z.B. Formaldehyd, Glyoxal oder Methylquecksilberhydroxid (Lehrach et al., 1977; Bailey et al., 1976), die dem Agarosegel zugesetzt werden. Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen erwies sich Methylquecksilberhydroxid als geeignetes Denaturierungsmittel, das bereits bei einer Konzentration von 5 mM die RNA vollständig denaturiert (Haid, persönliche Mitteilung) und ausserdem die Übertragung der RNA auf Filterpapier nicht negativ beeinflusst.

Molekulargewichtsbestimmung von mtRNAs

Eine genaue Molekulargewichtsbestimmung von mtRNAs, deren Laufverhalten trotz Denaturierung auf Grund ihres extrem niedrigen GC-Gehaltes (unter 23 %) von dem anderer mRNA-Spezies abweicht, würde eine Kalibrierung des Gels mit einzelsträngigen RNAs desselben GC-Gehaltes und bekannter Länge voraussetzen. Da solche Standards nicht zur Verfügung stehen, wurde zur Eichung die auf

dem EB-gefärbten Gel gut sichtbaren 15S-mt-rRNA (1600 b) und 21S-mt-rRNA (3200 b) verwendet, deren Längen bekannt waren (Tabak et al., 1979), (Abb. 9, Spur a₂). Da für dieses Gelsystem ermittelte Eichkurven bis zum Bereich von 26S einen annähernd linearen Verlauf haben (Van Ommen et al., 1979), war eine gute Molekulargewichtsbestimmung im Bereich von 10S bis 26S möglich, während die darüber liegenden S-Werte nur als Annäherung betrachtet werden können. (Vermutlich werden Molekulargewichte von RNAs, deren Länge gross ist im Vergleich zur Porengrösse des Gels, überschätzt; Lehrach et al., 1977). Die S-Werte und die dazu gehörigen Längen (b) sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Die Analyse von mRNAs durch Gelelektrophorese allein ermöglicht jedoch noch nicht die Entdeckung COB-spezifischer und eventuell nur in Spuren vorhandener mRNAs innerhalb des aufgetrennten RNA-gemisches, das je nach Präparation auch mit cyRNA kontaminiert ist. Diese wurden durch Hybridisierung mit COB-spezifischen ³²P-mtDNA-Proben nachgewiesen, nachdem die in Agarosegelen aufgetrennten RNAs auf DBM-Papier überführt wurden. Bei dieser von Alwin et al. (1977) entwickelten Technik werden die Nukleinsäuren kovalent an die Diazobenzyl-oxymethyl-gruppen des aktivierten Papiers gebunden. Zur Hybridisierung wurden, je nach Fragestellung, verschiedene ³²P-mtDNA-Restriktionsfragmente verwendet, die entweder Sequenzen der gesamten COB-Region oder nur Exon- oder IVS-spezifische Sequenzen enthielten. Die Isolation der Restriktionsfragmente erfolgte aus rho⁻-Stämmen, die auf Grund genetischer und physikalischer Daten einen Bereich der COB-mtDNA aufwiesen, der für die jeweilige Hybridisierung interessant war (vgl. Abb. 6 und 7). In manchen Fällen konnte die gesamte rho⁻-mtDNA ohne vorangegangene Restriktion verwendet werden, wenn deren Sequenz nicht über den für den Versuch erfordernten Bereich hinausging.

Die Verwendung von rho⁻-Stämmen zur Isolation COB-spezifischer Sequenzen durch Restriktion hat folgende Vorteile:

i) Durch die Reiteration der rho⁻-mtDNA wird die entsprechende zurückbehaltene Sequenz im Vergleich zum Wildtyp, der diese nur

S-Werte	Länge (b)
34	ca. 7500
32	6150
30	5450
28	4800
26	4150
23	3500
20	2850
18	2200
10	ca. 700
15S-mt-rRNA	1600 (Tabak et al., 1979)
21S-mt-rRNA	3200 (Heyting et al., 1979)

Tab. 3

S-Werte und die entsprechenden Längen (in b)
von COB-Transkripten

Die Ermittlung der S-Werte und der Längen erfolgte
durch Kalibrierung der Gele mit 15S-mt-rRNA und 21S-mt-rRNA
als interne Standards (vgl. Kap. 5.2.2 und 2.1).

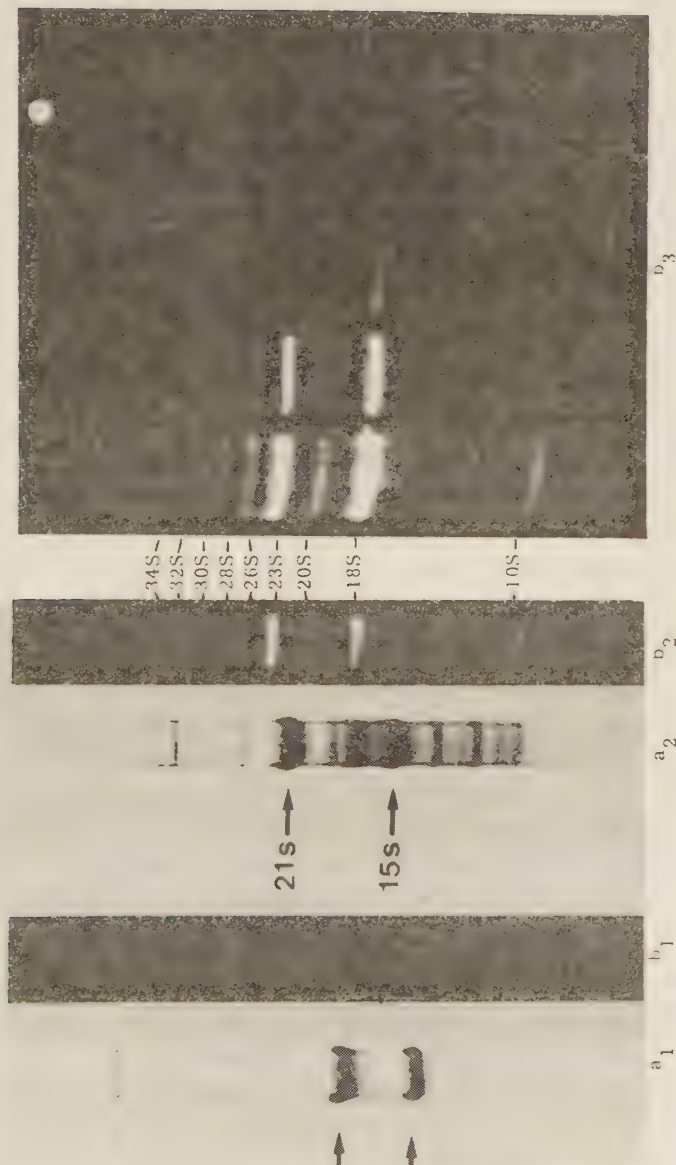


Abb. 9 Elektrophoretische Analyse von mtRNA des Wildtyps und Hybridisierung mit ^{32}P -mtDNA (Gesamt-C(13))

a₁ und a₂: EB-gefärbte Gele, b₁-b₃: Radioautographie nach Transfer des Gels auf D₁₁M Papier und Hybridisierung mit COB-spezifischer ^{32}P -mtDNA.

b₁: Hybridisierung mit cytoplasmatischer RNA (Kontrolle). b₂: Hybridisierung mit mtRNA, b₃: Hybridisierung mit mtRNA unterschiedlicher Konzentration (15 µg- 8 µg- 3 µg- 1.5 µg- 0.8 µg)

einmal pro Molekül besitzt, stark angereichert. Rho⁻-Stämme stellen somit ein natürliches "Cloning"-System dar und erübrigen die Klonierung aus WT-Fragmenten in Plasmiden, um genügende Ausgangsmengen für eine ³²P-Markierung zu erhalten.

ii) Die Gewinnung eines Restriktionsfragmentes aus dem Wildtyp wäre meist deshalb erschwert, weil diese noch mit einer unterschiedlichen Anzahl ähnlich grosser Restriktionsfragmente aus anderen Bereichen der mtDNA, die gleiches Laufverhalten in der Elektrophorese haben, kontaminiert wäre. Dies würde umständliche Reinigungsschritte, so z.B. Nachspaltung mit anderen Restriktionsenzymen und erneute Elektrophorese erforderlich machen.

Abb.10 zeigt in schematischer Darstellung alle Restriktionsfragmente, die für die einzelnen Hybridisierungen verwendet wurden. Tabelle 4 gibt wieder, aus welchen rho⁻-Stämmen diese isoliert wurden, sowie deren Längen.

Für eine erste Serie von Hybridisierungen wurde WT-mtRNA in unterschiedlichen Konzentrationen elektrophoretisch aufgetrennt und auf DBM-Papier überführt. Als Probe wurde ³²P-mtDNA verwendet, die die gesamte COB-Region enthielt (rho⁻ dD22). Die Ergebnisse sind in Abb.9 dargestellt: Spuren a₁ und a₂ zeigen die EB-gefärbten Agarosegele und zwar von cyrRNA (a₁) und mtRNA (a₂). Die in den Spuren sichtbaren starken Banden sind rRNAs, wobei die cytoplasmatischen rRNAs (25S und 18S) trotz höheren Molekulargewichts im Vergleich zu den mt-rRNAs (21S und 15S) eine grössere Wanderungsgeschwindigkeit vermutlich wegen ihres wesentlich höheren GC-Gehaltes besitzen. Spur b₁ zeigt die Radioautographie von cyrRNA hybridisiert mit COB-³²P-mtDNA. Man kann, wie erwartet, keine Hybridisierung erkennen, da in cyrRNA keine Sequenzen enthalten sind, die Homologien zu COB-mtDNA aufweisen. Dieser Kontrollversuch beweist damit, dass die nachfolgend beschriebenen Hybridisierungen spezifisch - d.h. ausschliesslich mit homologen Sequenzen - erfolgten. Spur a₂ zeigt das Elektrophorese-Muster von WT-mtRNA, bei der man ca. 20 verschiedene Banden erkennen kann und die dazu gehörige Radioautographie

Fragment	Enzym	Länge (bp)	isoliert aus rho ⁻ :
rf1	HindII	6400	dD22
rf2	BamHI	5400	dD22
rf3	AluI	750	dD22
rf4	AluI	690	P23
rf5	BamHI/ HaeIII	1150	dD22
rf6	EcoRI/ HaeIII	150	Bd4
rf7	HpaII	330	i121
rf8	HindII/ HpaII	180	MM1A9

Tab. 4

Herkunft der für die Hybridisierungsuntersuchungen verwendeten Restriktionsfragmente (vgl. Abb.10)

Zur Gelelektrophorese und Isolierung von Restriktionsfragmenten siehe Material und Methoden.

Sind in Spalte 2 zwei Enzyme angegeben, bedeutet dies, dass die Restriktion mit beiden Enzymen im Inkubationsansatz erfolgte (Doppelverdau). Als ³²P-mtDNA-Probe, die die gesamte COB-sequenz enthalten sollte, wurde ein Gemisch genommen, das rf 1 und rf2 in stöchiometrischen Mengen enthielt.

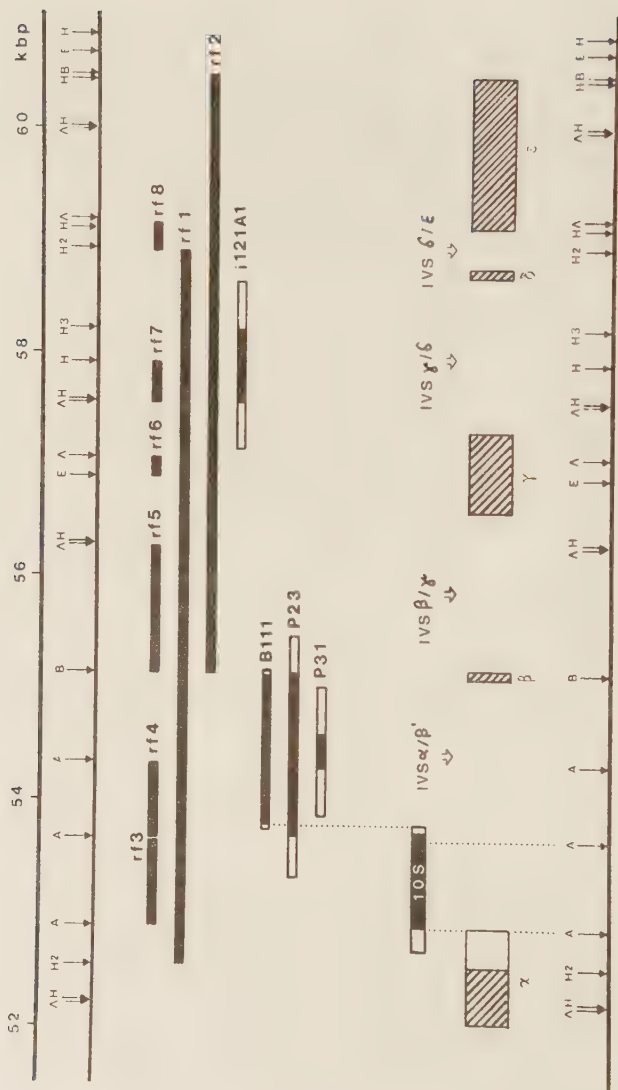


Abb. 10 Physikalische Karte der COB-Region und der für die Hybridisierungen verwendeten Restriktionsfragmente

Die Bezeichnungen entsprechen den in Abb. 7 angegebenen. Schwarze Balken symbolisieren die Lage der für die jeweilige Hybridisierung verwendeten Restriktionsfragmente (rf1 - rf8) bzw. rho'-mtDNA-Sequenzen. Zur Bedeutung der 10S-Region vgl. Text.

nach Transfer und Hybridisierung (b_2), (im folgenden kurz "Northern-Blot" genannt). Man kann eine Hybridisierung mit folgenden COB-Transkripten erkennen: 34S, 32S, 30S, 28S, 26S, 23S, 20S, 18S und 10S, entsprechend Längen von 7500 bis 700 b, wobei 18S-RNA die höchste Konzentration besitzt. Das Auftreten dieser verschieden langen COB-RNAs deutet darauf hin, dass die COB-Region als Ganzes transkribiert wird und der reife Messenger durch stufenweise Verkürzungen der RNA-Vorstufen, also durch ein "Processing", gebildet wird. Die 18S-RNA ist vermutlich der reife Messenger für Apocytochrom b, da:

- i) von allen gefundenen Banden die Hybridisierung mit 18S-RNA und damit deren Konzentration am grössten ist, was man auch gut erkennt, wenn man mtRNA mit abnehmenden Konzentrationen für die Hybridisierung verwendet (Abb.9, Spur b_3),
- ii) 18S-RNA die geringste Länge (2200 b) besitzt, wenn man von 10S-RNA absieht, deren Länge (ca. 700 b) nicht ausreicht, um für Apocytochrom b (30 KD, erforderliche Länge der mRNA: mindestens 900 b) zu kodieren.

Diese Annahmen stehen in Einklang mit früheren Arbeiten von Van Ommen et al. (1977,1979) und Grivell et al. (1979).

Zur Bestätigung dieser Vermutungen wurde mtRNA des Wildtyps mit verschiedenen ^{32}P -COB-mtDNA-Sequenzen hybridisiert, die nur noch Teilstücke der COB-Region enthielten. So sollten ^{32}P -mtDNA-Proben, die IVS-spezifische Sequenzen enthalten, ausschliesslich mit mRNA-Vorstufen, die die entsprechende IVS noch enthalten, hybridisieren. Eine Hybridisierung mit dem eigentlichen Messenger, der definitionsgemäss keine IVS mehr enthält, sollte dagegen unterbleiben. Diese Untersuchungen sollten gleichzeitig Aufschluss darüber geben, ob die Excisionen der einzelnen IVS in einer bestimmten Reihenfolge stattfinden. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb.11 dargestellt. Eine Hybridisierung mit 18S-RNA, dem vermuteten Messenger, tritt nur ein, wenn ^{32}P -mtDNA-Proben verwendet wurden, die entweder nur Exon-spezifische Sequenzen enthielten (Abb.11, Spur h;) oder

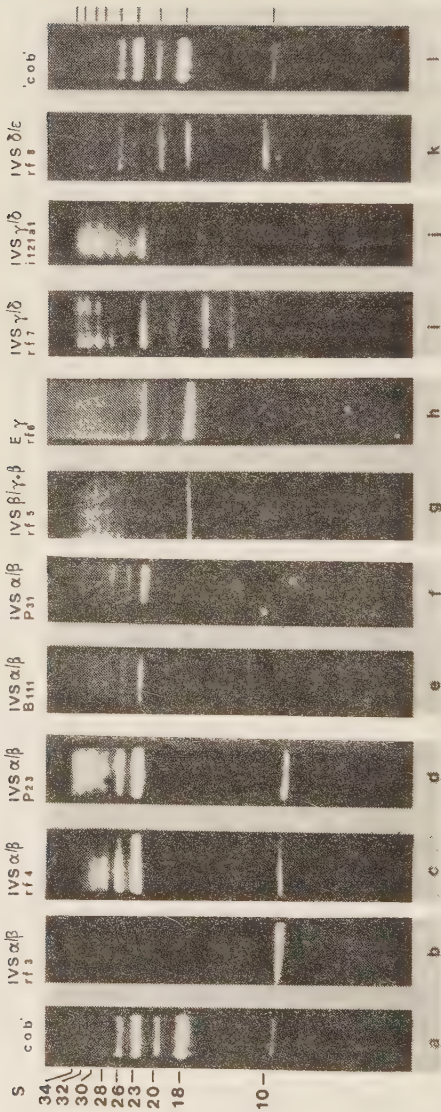


Abb. 11 COB-Transkripte und ihre Zusammensetzung im Wildtyp

mtRNA des Wildtyps wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt, auf DEBM-Papier übertragen und mit ^{32}P -mtDNA hybridisiert, die verschiedene Sequenzen der COB-Region enthält. Die Bezeichnung der verwendeten ^{32}P -mtDNA-Probe befindet sich über den jeweiligen Filterstreifen. Zur Herkunft und Position der einzelnen Restriktionsfragmente innerhalb der physikalischen Karte (rf1 - 8) und rho-mtDNAs vgl. Abb. 10 und Tab. 4. Die Spuren a und l zeigen zum Vergleich die Hybridisierungsmuster des WT mit ^{32}P -mtDNA, die die gesamte COB-Region enthielt (rf1 + rf2).

Exon- und IVS-Sequenzen (Abb.11, Spur g; IVS $\beta/\gamma + \beta$, rf5), nicht jedoch bei ^{32}P -mtDNA-Proben, die nur IVS-spezifische Sequenzen enthielten (Spuren b,c,d,e,f,i,j). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass die 18S-RNA-Spezies den eigentlichen Messenger darstellt und die höhermolekularen RNAs (über 20S) Vorstufen darstellen, die noch IVS in verschiedenen Kombinationen enthalten.

2.2 Zusammensetzung der COB-Transkripte im Wildtyp/ Excisionsreihenfolge der IVS

a) IVS α/β : Spur b (Abb.11), bei der als ^{32}P -mtDNA-Probe rf3, das nur den α -proximalen Teil von IVS α/β , enthält, verwendet wurde, zeigt nur Hybridisierung mit 10S-RNA; rf4 und mtDNA von ρ^- P23 (vgl. Abb.7), die sich von rf3 ausgehend zum α -distalen Teil von IVS α/β erstrecken, hybridisieren ebenfalls mit 10S-RNA, zusätzlich jedoch mit allen Vorstufen von 23S bis 34S (Abb.11, Spuren c und d). ρ^- P31 und B111, die nur den α -distalen Teil von IVS α/β besitzen, hybridisieren nicht mit 10S-RNA, jedoch mit einer Reihe von Transkripten zwischen 23S und 34S (Abb.11, Spuren e und f). Diese Ergebnisse führen zu folgendem Schluss, der noch durch weitere Untersuchungen in folgenden Teilen dieser Arbeit bestätigt wurde:

i) IVS α/β wird in zwei Teilschritten aus dem primären Transkript entfernt. Ein α -proximaler Teil (die 10S-Sequenz) wird sehr früh, wahrscheinlich als 1. Schritt entfernt, da die entsprechende ^{32}P -mtDNA-Probe (rf3) mit keiner der RNA-Vorstufen (20S-34S) hybridisiert und diese damit die 10S-Sequenz bereits nicht mehr enthalten. Hybridisierung findet ausschliesslich mit der excisierten RNA-Sequenz statt. Auf Grund der Hybridisierungsdaten ist die 10S-Sequenz in der physikalischen Karte gut lokalisierbar (Abb.10). Sie erstreckt sich über das gesamte AluI-Fragment rf3 (750 bp), reicht noch ein kurzes Stück in rf4, jedoch nicht weiter als zum linken Ende der ρ^- -mtDNA von B111, die mit 10S-RNA nicht mehr hybridisiert (Abb.11, Spur e). Da die Länge der 10S-RNA auf Grund der elektrophoretischen Daten etwa 700 b beträgt, kann sie sich nach links

- wenn überhaupt - nur kurz über rf3 hinaus erstrecken.

ii) der restliche Teil von $IVS \alpha / \beta$, also der α -distale Teil (im folgenden $IVS \alpha / \beta'$ genannt) wird bevorzugt erst zu einem späteren Zeitpunkt aus den RNA-Vorstufen entfernt, da mit entsprechenden ^{32}P -mtDNA-Proben (Abb. 11, Spuren e und f) eine starke Hybridisierung mit RNA-Vorstufen von 23S - 34S erfolgt, diese somit noch $IVS \alpha / \beta'$ enthalten. Da 23S-RNA eine Länge von 3600 b hat, 18S-RNA eine Länge von 2200 b und $IVS \alpha / \beta'$ eine Länge von ca. 1400 b ($\hat{=}$ Länge von Gesamt- $IVS \alpha / \beta$ abzüglich der Länge der 10S-RNA von ungefähr 700 b), würde diese RNA-Spezies einer Vorstufe entsprechen, die neben allen kodierenden Sequenzen zusätzlich noch eine $IVS (\alpha / \beta')$ enthält.

b) Eine ^{32}P -mtDNA-Probe, die Sequenzen für β und $IVS \beta / \gamma$ enthält (Abb. 11, Spur g; rf5) hybridisiert nur schwach mit allen COB-Transkripten. Erst nach längerer Exponierungsdauer der Radioautographie sind neben der 18S-RNA höhermolekulare Vorstufen zu entdecken, hauptsächlich 28S und 30S. Das deutet darauf hin, dass $IVS \beta / \gamma$ sehr schnell und damit sehr früh aus dem primären Transkript herausgeschnitten wird, da alle mRNA-Vorstufen diese Sequenz nicht mehr enthalten. (Die nach längerer Exponierungsdauer erkennbaren Hybridisierungen sind darauf zurückzuführen, dass die ^{32}P -mtDNA-Probe Teile des kurzen Exons β enthält).

c) ^{32}P -mtDNA, spezifisch für $IVS \gamma / \delta$ (Abb. 11, Spuren i und j), zeigt Hybridisierungen mit RNA-Zwischenstufen von 23S bis 34S. Die Hybridisierung mit den längeren Vorstufen (30S-34S) ist stärker, die mit 23S jedoch schwächer im Vergleich zur Hybridisierung mit ^{32}P -Gesamt-COB-mtDNA (Abb. 11, Spuren a und l). Das bedeutet, dass $IVS \gamma / \delta$ im letzten Schritt herausgeschnitten werden kann (aus 23S-RNA: 23S, 3600 b $\rightarrow$ 18S, 2200 b; Länge von $IVS \gamma / \delta$: 1400 b), die starke Hybridisierung mit 30S- bis 34S-RNA deutet jedoch auf eine bevorzugte Excision bereits aus frühen Vorstufen (vor allem: 28S $\rightarrow$ 23S) hin, alternativ zu $IVS \alpha / \beta'$ (siehe oben).

d) Die $IVS \delta / \epsilon$ -Probe (Abb. 11, Spur k; rf8) hybridisiert mit

26S und 20S-RNA; letztere RNA besitzt eine Länge von 2900 b, entsprechend einer RNA-Vorstufe, die neben den kodierenden Sequenzen noch eine kurze IVS, nämlich δ/ϵ (Länge: ca. 650 b), enthält (18S + IVS δ/ϵ $\rightarrow$ 20S). 26S-RNA dürfte zusätzlich noch entweder IVS α/β^1 oder IVS γ/δ enthalten. Daraus folgt, dass IVS δ/ϵ bei einem Teil der RNA-Vorstufen bis zum letzten Reifungsschritt (20S $\rightarrow$ 18S) enthalten bleibt. Der Befund, dass 23S- und 28S-RNA nicht mit der IVS δ/ϵ -Probe hybridisierten, weist auf eine sehr frühe Excision dieser IVS in einem anderen Teil der RNA-Moleküle hin.

Neben Hybridisierung mit Vorstufen (20S bis 34S) hybridisieren ^{32}P -mtDNA-Proben für IVS γ/δ zusätzlich mit RNA-Spezies, die kürzer sind als alle COB Zwischenstufen nämlich mit 19S, 16S und 14S (Abb.11, Spuren i und j). Bei 14S-RNA ($\approx$ 1300 b) könnte es sich um die herausgeschnittene IVS γ/δ (1300 b) handeln, die noch in geringer Konzentration vorhanden ist. Da in IVS γ/δ zum Teil Sequenzhomologien zum Bereich OXI 3, dem Gen für Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase, nachgewiesen wurden (Tzagoloff et al., 1980), könnte eine Kreuzhybridisierung mit mRNAs dieser Region entstanden sein, die u.U. das Signal für 19S- und 16S-RNA erklären würde. Ähnliches könnte auch für IVS δ/ϵ gelten (Abb.11, Spur k), bei der zusätzlich eine Hybridisierung mit 18S- und 11S-RNA zu finden ist. Während bei letzterer es sich ebenfalls um die excisierte IVS ($\approx$ 700 b) handeln könnte, liesse sich das Auftreten der 18S-RNA u.U. durch Kontamination der ^{32}P -mtDNA-Probe mit kodierenden Sequenzen erklären.

Die Zusammenfassung dieser Resultate (Abb.11) lässt folgende Schlüsse über die Reifungsschritte der mRNA-Vorstufen zu:

Es gibt offensichtlich keine einzige, starre Reihenfolge, so z.B., dass IVS α/β^1 grundsätzlich vor IVS β/γ herausgeschnitten werden muss. An Hand der gefundenen Zusammensetzungen für die einzelnen Transkripte und ihrer relativen, mittels Hybridisierung

nachgewiesenen Konzentrationen kann man jedoch erkennen, dass es bevorzugte Reihenfolgen gibt. Diese sind in Abb.12 dargestellt: Aus einer 34S-RNA wird im ersten Schritt IVS α / β_{10S} entfernt; dieser Schritt läuft offensichtlich bei allen RNA-Molekülen als erster ab. Danach erfolgt die Excision in folgender bevorzugter Reihenfolge: IVS $\delta / \epsilon \rightarrow$ IVS $\beta / \gamma \rightarrow$ IVS γ / δ (oder IVS α / β') $\rightarrow$ IVS α / β' (oder IVS γ / δ) $\rightarrow$ 18S-RNA. Andere, etwas weniger häufig benützte Reifungswege unterscheiden sich von diesem durch die spätere Excision von IVS δ / ϵ (Abb.12; $\rightarrow$ bzw. $\rightarrow\rightarrow\rightarrow$). Ob weitere Reifungswege von kleinen Anteilen der Transkriptmoleküle durchlaufen werden, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beurteilt werden. Alle führen schliesslich zu einer 18S-RNA-Spezies, dem fertigen Messenger für Apocytochrom b.

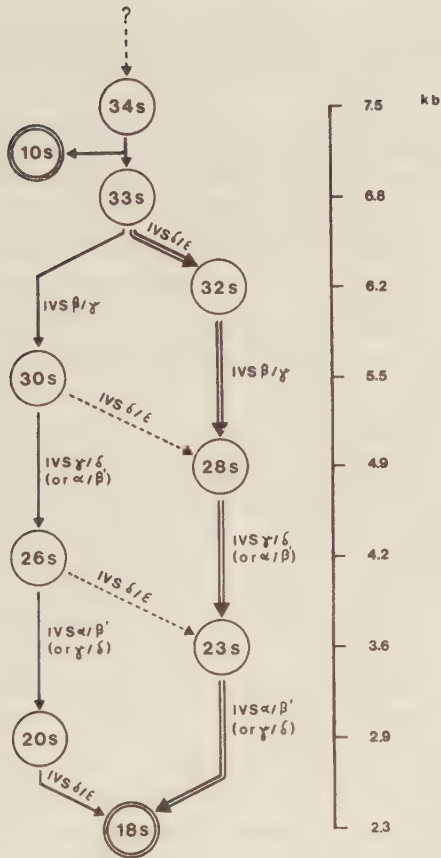


Abb. 12

Bevorzugte Reihenfolge der Reifungsschritte von COB-Transkripten im Wildtyp

Die Grösse von stabilen Transkripten (Doppelkreise) und Zwischenstufen (einfache Kreise) sind in S-Werten, auf der rechten Skala die entsprechenden Längen (kb) angegeben. Die Excision einzelner IVS ist durch einen Pfeil dargestellt. Entsprechend der Häufigkeit, in der die einzelnen Reifungswege vorkommen, sind Doppel-, einfache oder unterbrochene Pfeile angegeben. Weitere Möglichkeiten an Excisionsfolgen werden nicht ausgeschlossen, die dabei eventuell auftretenden Zwischenstufen bleiben jedoch unter der durch die Methodik bedingten Nachweisgrenze.

2.3 Hybridisierung von mtRNA aus mit ³²P-Mutanten mit ³²P-COB-mtDNA

Die bis hierher gezeigten Versuche erlaubten Aussagen über die Zusammensetzung von mRNA-Vorstufen der COB-Region in Zellen des Wildtyps und deren Reifungsschritte. Um weiteren Einblick in den Vorgang des "Processing" der COB-Region zu gewinnen, schien es wichtig, die Transkripte von Hefestämmen zu untersuchen, von denen man annehmen konnte, dass sie auf Grund von Mutationen Störungen in Transkription oder Transkript-"Processing" aufwiesen. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass Mutationen, die die korrekte Synthese von Apocytochrom b verhindern, sowohl in kodierenden als auch in intervenierenden Sequenzen liegen. Analysen der Translationsprodukte ergaben, dass die Mehrheit der Mutationen in kodierenden Sequenzen - durch Stopkodons oder Verschiebung des Leserahmens - zum vorzeitigen Kettenabbruch führen. Es wurden nur noch Fragmente von Apocytochrom b gefunden; diese variieren in ihrer Länge entsprechend der Lage des Mutationsortes innerhalb der genetischen Karte, sind also kolinear (Slonimski et al., 1978b; Haid et al., 1979; Bechmann et al., 1981). Mutationen in IVS führen dagegen zur Akkumulation von jeweils mehreren neuen Polypeptiden, die zum Teil länger sind als Apocytochrom b, alle jedoch immunologisch mit dem Wildtyp-Protein verwandt sind. Diese Beobachtung stützte die Hypothese, dass Mutationen in IVS - im Gegensatz zu Mutationen in kodierenden Bereichen, die sich auf Translationsebene auswirken - zur Störung eines korrekten "Processing" von COB-Transkripten führen (Solioz und Schatz, 1979; Kreike et al., 1979). Eine Blockierung des "Processing" sollte zur Anhäufung von mRNA-Vorstufen führen, vorausgesetzt, diese werden nicht vorzeitig und unspezifisch abgebaut. Im Gegensatz zur Situation im Wildtyp, wo Vorstufen mit Molekulargewichten über 30S - wenn überhaupt - nur in Spuren nachweisbar sind, sollte es daher möglich sein, die hochmolekularen, akkumulierten mRNA-Vorstufen durch "Northern-Blots" nachzuweisen.

2.3.1 Hybridisierung von mtRNA aus mit⁻-Mutanten (IVS) mit ³²P-COB-mtDNA

Um zu prüfen, wie sich Mutationen in IVS auf die Reifung der mRNA auswirken, wurde RNA aus 18 cob⁻-Mutanten untersucht, die in folgenden IVS kartierten: IVS α / β 10S, IVS α / β , IVS β / γ , IVS γ / δ . Die Ergebnisse der Hybridisierungen mit ³²P-COB-mtDNA (vgl. Abb.10, rfl+2) sind in Abb. 13 und in Tabelle 5 wiedergegeben. Abb.13 enthält zum Vergleich ausserdem mtRNA des Wildtyps; die IVS-Mutanten wurden als typische Vertreter für die jeweilige Region ausgewählt.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, sind Mutanten einer IVS in ihrem Transkriptmuster im wesentlichen gleich, (wobei man in IVS α / β zwei Gruppen von Transkriptmustern unterscheiden kann, entsprechend der Lokalisierung in IVS α / β 10S bzw. IVS α / β'). Wie aus Abb.13 und Tab.5 zu erkennen ist, ändert sich das Transkriptmuster jedoch für die verschiedenen IVS sehr stark gegenüber dem Wildtyp.

Mutanten, die in IVS α / β 10S liegen, zeigen die Akkumulation einer 34S-RNA neben einer schwachen Bande, die 30S-RNA entspricht. (Abb.13, Spur b). Kleinere Transkripte, vor allem 10S-RNA können nicht entdeckt werden. Da 34S-RNA eine Länge von ca. 7500 b besitzt, würde dies einer Spezies entsprechen, die noch alle IVS enthält, also dem "Gesamt-COB"-Transkript. Wie aus Abb.14 ersichtlich ist, bei der mtRNA aus IVS-Mutanten gegen IVS-spezifische ³²P-mtDNA-Proben hybridisiert wurde, reagiert 34S-RNA mit allen verwendeten IVS-³²P-mtDNA-Proben (IVS α / β 10S, IVS α / β' , IVS γ / δ ; Abb.14, Spuren a₂ bis a₄).

Mutationen in IVS α / β' , also dem α -distalen Teil von IVS α / β , führen zur Akkumulation von 32S-RNA, neben einem schwächeren Signal für 34S-RNA, und zeigen deutliche Hybridisierung mit 10S-RNA (Abb.13, Spur c). Andere Transkripte sind nicht nachweisbar. Das heisst, dass hier zwar noch die vor dem Mutationsort liegende IVS α / β 10S herausgeschnitten werden kann, alle anderen IVS

Stamm	temp. - abh.	COB-mRNA-Zwischenstufen									
		34S	32S	30S	28S	26S	24S	23S	20S	18S	10S
wt	-	(+)	(+)	+	+	+		++	+	+++	++
α	M4205	-	++		++			+++		+++	+++
	M5020	-	++	+++	+						(+)
	M591	-		++	++			++		++	++
	M2499	-	++	+++	+						(+)
	M2602	-	++	+++	+						(+)
	M751	-	+	++	+						(+)
	M4577	-		++	++			+++		+++	++
	M1231	-		++	++			+++		+++	++
	M6821	-		++	+						+
	M771	-		+++	+						+
	M4901	-		++	++			+++		+++	++
	M611	-	+	+++	++			+			+
IVS α /10S	G5049	-	++								
	M1301	-	++		+						
	M4873	hs/cs	+++		++	++			+		
IVS α /13'	M4942	cs		+++	++			+			+
	M501	-		+++	+						+
	M4111	-	+	+++	+						+
	G1370	-	+	+++	++			+			++
	M1233	-	+	+++	+						++
	M561	-	+	+++							+
	G5046	-	+++	++	+						+
β	M2011	-		+	++	+		++	+	+++	++
IVS β /8	M811	-			+++		+++		+		+++
	M4881	-			++		+++				+++
	M7793	-			+++		++				++
δ	M5025	-		+	+	++	+	+++	+	++	++
IVS δ /8	M3881	cs						+++			+
	M4751	hs/cs						++			+
	M4359	hs/cs			+	+		+++			++
	M1431	hs/cs			+	+		+++			++
	G2590	-						+++			++
ϵ	M2911	-		+	++	+		++	+	+++	++
ζ	M1354	-		+	++	+		++	+	+++	++

Tab. 5 Ergebnisse der "Northern-Blots" (Text umseitig)

Tab. 5

Ergebnisse der "Northern-Blots" mit mRNA aus 34 cob^- -Mutanten

Die Anordnung der Mutanten entspricht ihrer Lage innerhalb der genetischen Karte (vgl. Abb. 6) in Richtung OLI 2 ---> OLI 1.

hs: hitzesensibel (36°C), cs: kältesensibel (20°C)

(+): war nur nach verlängerter Radioautographie nachweisbar

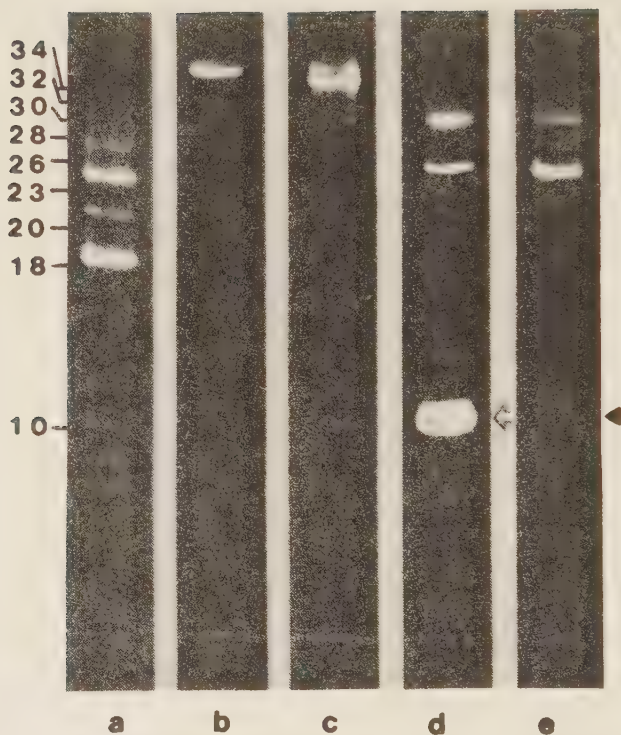


Abb. 13

COB-Transkripte von cob^- -Mutanten aus IVS-Bereichen

Elektrophorese und Hybridisierung: vgl. Material und Methoden.
Als ^{32}P -mtDNA-Probe wurden $\text{rf1} + \text{rf2}$ (vgl. Abb. 10) verwendet,
die die gesamte COB-Region abdecken.

mtRNA folgender cob^- -Mutanten wurde benutzt:

- a) Wildtyp (zum Vergleich), b) M1301 (IVS α/β 10S),
- c) M1233 (IVS α/β'), d) M811 (IVS β/γ), e) M4359 (IVS γ/δ).

jedoch nicht mehr. Der Übergang von 34S (ca. 7500 b) zu 32S (ca. 6200 b), entsprechend einer Längendifferenz von 1300 b, bedeutet, dass neben IVS α/β 10S die zweite kurze Sequenz, also IVS δ/ϵ , ebenfalls excisiert worden ist. Diese Befunde werden durch die in Abb. 14 (Spuren b_2 bis b_4) dargestellten Hybridisierungen weiter bestätigt. Die 32S-RNA hybridisiert mit allen verwendeten IVS- ^{32}P -mtDNA-Proben, ausser mit ^{32}P -mtDNA aus IVS α/β 10S (Spur b_2); diese Probe hybridisiert, wie erwartet, ausschliesslich mit der excisierten 10S-RNA-Sequenz. Auf Grund der Hybridisierungsergebnisse und der Längen der Transkripte (vgl. auch Tab. 5) kann man somit schliessen, dass Mutanten aus IVS α/β' diese und die in Transkriptionsrichtung folgenden grossen IVS β/γ und γ/δ nicht mehr oder nur noch schwach excisieren können.

Ein Hybridisierungsmuster, typisch für Mutanten aus IVS β/γ , ist in Abb. 13, Spur d, dargestellt (vgl. auch Tab. 5). Man erkennt eine Hybridisierung mit 28S-, 24S- und 10S-RNA. Die kürzeste Zwischenstufe, 24S-RNA (3700 b), enthält IVS α/β und IVS γ/δ nicht mehr, da sie nicht mit ^{32}P -mtDNA-Proben, spezifisch für IVS α/β 10S (Abb. 14, Spur c_2), IVS α/β' (Spur c_3) oder IVS γ/δ (Spur c_4) hybridisiert. Sie muss demnach neben den kodierenden Sequenzen ausschliesslich IVS β/γ (2200 b + 1450 b = 3650 b) enthalten. 28S-RNA, die in Mutanten aus IVS β/γ die Hauptkomponente darstellt, enthält zusätzlich IVS γ/δ : Sie hybridisiert mit ^{32}P -mtDNA spezifisch für IVS γ/δ (Abb. 14, Spur c_4). Daraus kann geschlossen werden, dass Mutationen in IVS β/γ deren Excision verhindern und Excision von IVS γ/δ zumindest stark erschweren. Excision von IVS α/β 10S und IVS α/β' findet jedoch noch statt, wobei - im Gegensatz zum Wildtyp - IVS α/β' vollständig vor IVS γ/δ entfernt wird (vgl. Abb. 14, Spuren c_3+c_4). Erstaunlich ist die starke Hybridisierung mit 10S-RNA; diese Spezies ist bei Mutanten aus IVS β/γ bereits im EB-gefärbten Gel sichtbar (nicht gezeigt).

Mutationen in IVS γ/δ zeigen ebenfalls alle das gleiche Muster:

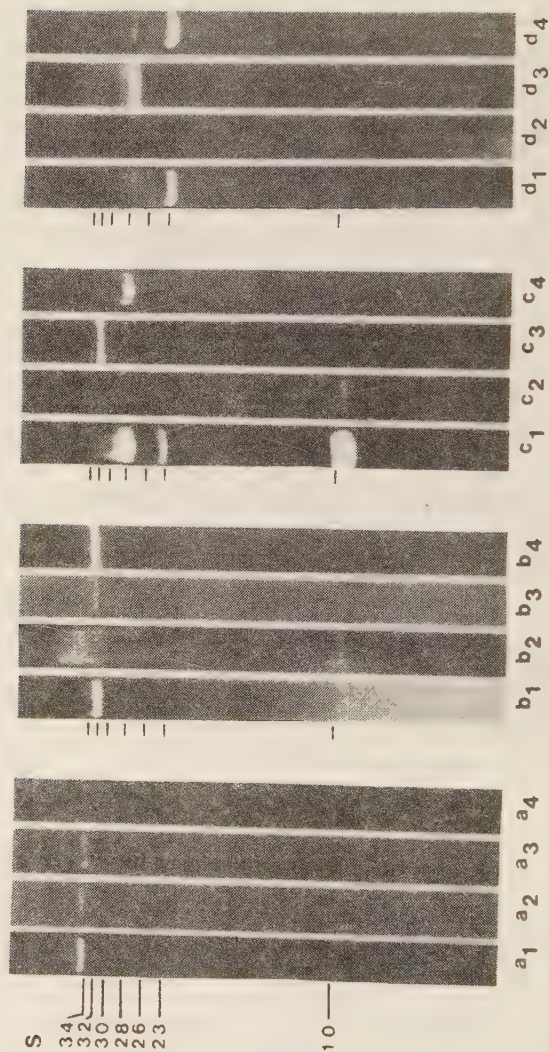


Abb. 14 Zusammensetzung von COB-Transkripten in IVS-Mutanten

Die Spuren a_1 bis a_4 enthalten mRNA einer Mutante aus IVS α / β 1CS (M1301), Spuren b_1 bis b_4 einer Mutante aus IVS α / β' (M561), Spuren c_1 bis c_4 einer Mutante aus IVS β / γ (M1392) und Spuren d_1 bis d_4 einer Mutante aus IVS γ / δ (M1431).

Folgende IVS-spezifische ^{32}P -mtDNA-Proben wurden verwendet:

a_1, b_1, c_1 und d_1 : Gesamt-COB (rf1 + rf2; als Referenz)

a_2, b_2, c_2 und d_2 : IVS α / β 10S (rf 3)

a_3, b_3, c_3 und d_3 : IVS α / β' (rho P31)

a_4, b_4, c_4 und d_4 : IVS γ / δ (rf 7)

Es tritt eine Akkumulation von 23S-RNA ein, schwächere Signale sowohl für 10S-RNA als auch für 26S- und 28S-RNA sind ebenfalls vorhanden (Abb.13, Spur e; Tab.5). 23S-RNA enthält zusätzlich zu den kodierenden Sequenzen noch IVS γ/δ selbst: In Abb.14, (Spuren d_2 und d_4) zeigt nur die ^{32}P -mtDNA-Probe aus IVS γ/δ eine Hybridisierung mit 23S-RNA, d.h. es ist nur die Excision der IVS blockiert, in der die Mutation liegt. Die Reihenfolge der Reifungsschritte der übrigen IVS scheint denen des in Abb.12 rechts dargestellten Weges im Wildtyp zu entsprechen: IVS α/β 10S und IVS δ/ϵ $\rightarrow$ IVS β/γ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ $\rightarrow$ IVS α/β' $\rightarrow$ 23S ($\cong$ 18S + IVS γ/δ).

2.3.2 Hybridisierung von mtRNA der cob^- -Mutanten M4873 und M4942 mit verschiedenen IVS-spezifischen ^{32}P -mtDNA-Proben

Ein Teil der Mutanten aus IVS α/β 10S und IVS α/β' zeigt phänotypisch ein temperaturabhängiges Wachstum auf Glycerin. Sie wachsen bei 30°C ähnlich dem Wildtyp; bei 36°C und zum Teil auch bei 23°C ist ihr Wachstum zwar nicht eingestellt, jedoch stark reduziert ("leaky") (Haid et al., 1979; Bechmann et al., 1981). Zwei dieser Mutanten, M4873 und M4942, genetisch kartiert im Grenzbereich zwischen IVS α/β 10S und IVS α/β' , wurden einer genaueren Untersuchung unterzogen. M4873 zeigt bei der Analyse der Transkripte, ähnlich den Mutanten aus IVS α/β 10S, eine Anreicherung von 34S-RNA und das Fehlen der 10S-RNA; daneben sind 30S-, 26S- und 20S-RNA in abnehmender Konzentration nachweisbar (Abb.15, Spur a_1). M4942 zeigt wie andere Mutanten aus IVS α/β' eine Anreicherung von 32S-RNA und die excisierte 10S-Sequenz, daneben aber 28S- und 23S-RNA (Abb.15, Spur a_2). Bei diesen Mutanten ist offensichtlich das "Processing" nicht vollständig gehemmt, sondern nur sehr stark gebremst. Die Zusammensetzung der einzelnen Transkripte wird aus den folgenden Experimenten deutlich:

M4873: Die Hybridisierung einer ^{32}P -mtDNA-Probe spezifisch für IVS α/β 10S mit Transkripten dieser Mutante zeigt, dass

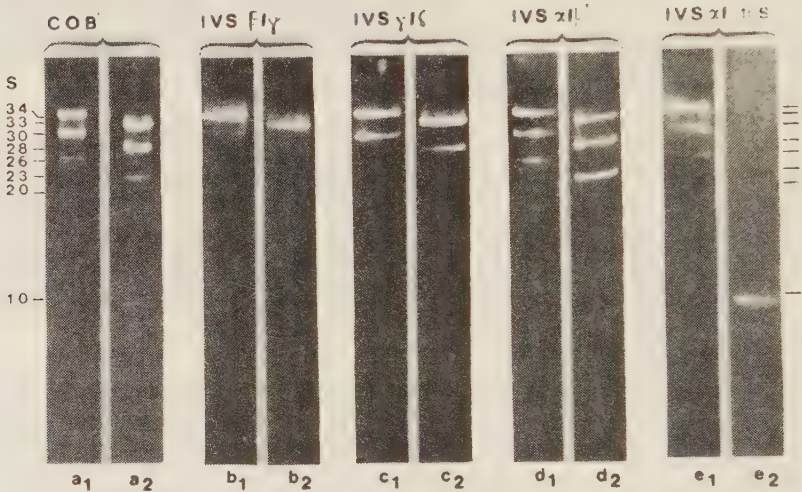


Abb. 15

COB-Transkripte in den Mutanten M4873 (IVS α/β 10S) und M4942 (IVS α/β') und ihre Zusammensetzung

Die Spuren a₁ bis e₁ enthalten mtRNA aus M4873, die Spuren a₂ bis e₂ mtRNA aus M4942. Diese wurden mit verschiedenen ³²P-mtDNA-Proben hybridisiert.

Spuren a₁ und a₂ zeigen das vollständige COB-Transkriptmuster durch Hybridisierung mit ³²P-mtDNA, spezifisch für Gesamt-COB (rf1 + rf2). Für die anderen Hybridisierungen wurden folgende Proben verwendet:

b₁ und b₂: IVS β/γ (rf 5), c₁ und c₂: IVS γ/δ (rf 7),

d₁ und d₂: IVS α/β' (P31), e₁ und e₂: IVS α/β 10S (rf 3)

IVS α / β 10S in allen Transkripten von 34S bis 20S enthalten bleibt (Abb.15, Spur e_1). 20S-RNA (2900 b) stellt das Transkript dar, das neben allen kodierenden Sequenzen (zusammen 2200 b) nur noch IVS α / β 10S (ca. 700 b) enthält, da allein eine ^{32}P -mtDNA-Probe, spezifisch für IVS α / β 10S, mit dieser RNA hybridisiert (Abb.15, Spur b_1 bis e_1). Die Excision aller anderen IVS ist möglich und geschieht in einer strikten Reihenfolge, wie man in Abb. 15 (Spuren $b_1 \rightarrow c_1 \rightarrow d_1 \rightarrow e_1$) sieht. Der Excision von IVS β / γ , die nur noch in 34S-RNA enthalten ist (Spur b_1), folgt die Excision von IVS γ / δ (Spur c_1), die aus dem 30S-Transkript geschnitten wird und danach die Excision von IVS α / β' aus der 26S-RNA (Spur d_1).

M4942: Anders als bei M4873 ist es hier IVS α / β' , die in allen Transkripten erhalten bleibt (Spur d_2). 23S-RNA (3600 b) entspricht einer RNA-Spezies, die neben den kodierenden Sequenzen (2200 b) noch IVS α / β' enthält (ca. 1400 b). Auch bei M4942 ist die Excision anderer IVS möglich und geschieht abenfalls in strikter Reihenfolge (Abb.15; Spuren $b_2 \rightarrow c_2 \rightarrow d_2 \rightarrow e_2$). Nach Excision von IVS β / γ aus 32S-RNA (Spur b_2) erfolgt die Excision von IVS γ / δ (Spur c_2). Wie Spur e_2 zeigt, hybridisiert ^{32}P -mtDNA, spezifisch für IVS α / β 10S mit keiner der RNA-Vorstufen, sondern ausschliesslich mit der excisierten Sequenz (10S); die Excision von 10S stellt damit in M4942 den ersten Schritt dar.

Die Grössen der Transkripte von 34S, 30S, 26S und 20S (M4873, Spur a_1) bzw. 32S, 28S und 23S (M4942, Spur a_2) differieren jeweils um 1200-1400 b, entsprechend der Länge von grossen IVS (vgl. Abb. 12). Die Excision von IVS δ / ϵ mit einer Länge von ca. 700 b muss daher der früheste und damit der erste der untersuchten Excisionsschritte (vor Excision von IVS β / γ) gewesen sein, zusammen mit IVS α / β 10S in M4942. Ansonsten hätten im Transkriptmuster (Abb.15) Übergänge von ca. 700 b zwischen den einzelnen RNA-Banden stattfinden müssen (vgl. Abb.11).

Diese Befunde zeigen, dass die Reihenfolge der Excision der einzelnen IVS, soweit sie nicht blockiert ist, bei beiden Mutanten der in Abb.12 dargestellten Haupt-Reihenfolge des Wildtyps entspricht. Beide Mutanten liegen auf Grund genetischer Kartierung sehr eng beieinander (Bechmann et al., 1981; und unveröffentlichte Daten; vgl. auch Abb.6) und es ist sehr wahrscheinlich, dass sie in der Nähe oder in dem Bereich selbst lokalisiert sind, der die "Splicing"-Stelle von IVS α / β 10S und IVS α / β' darstellt. Da beide Mutanten geringe Mengen an Apocytochrom b produzieren können (Bechmann et al., 1981), ist zu schliessen, dass auch die Excision von IVS α / β 10S (M4873) und IVS α / β' (M4942) - wenn auch in Hybridisierungsexperimenten nicht entdeckbar - so doch stattgefunden haben, da nur dann der Messenger (18S-RNA) zur Verfügung steht.

2.3.3 Hybridisierung von mtRNA aus cob^- -Mutanten der Exons mit 32 P-COB-mtDNA

Die Hybridisierungsmuster von Mutanten, die innerhalb der kodierenden Sequenzen β , γ , δ und ϵ kartiert sind, mit einer 32 P-COB-mtDNA-Probe, sind nicht von dem Wildtypmuster unterscheidbar (Abb.16, Spuren c bis f): Sie alle zeigen neben Hybridisierung mit 10S-RNA das stärkste Signal für 18S-RNA; höhermolekulare Vorstufen liegen in abnehmenden Konzentrationen vor. In einer der Mutanten aus Exon γ (Abb.16, Spur d; M5025) scheint das "Processing" etwas behindert zu sein, da hier die 23S-RNA eine stärkere Hybridisierung zeigt als 18S-RNA. Damit bestätigen sich frühere Vermutungen, dass Mutationen im Bereich von kodierenden Sequenzen der COB-Region auf der Ebene der Translation wirken, indem sie zum vorzeitigen Kettenabbruch der Proteine führen (Haid et al., 1979; Kreike et al., 1979; Bechmann et al., 1981). Sie scheinen den Reifungsprozess des primären Transkriptes zum fertigen Messenger nicht zu stören: Es entsteht eine 18S-RNA, die zwar die gleiche Länge wie der Wildtyp-Messenger besitzt,

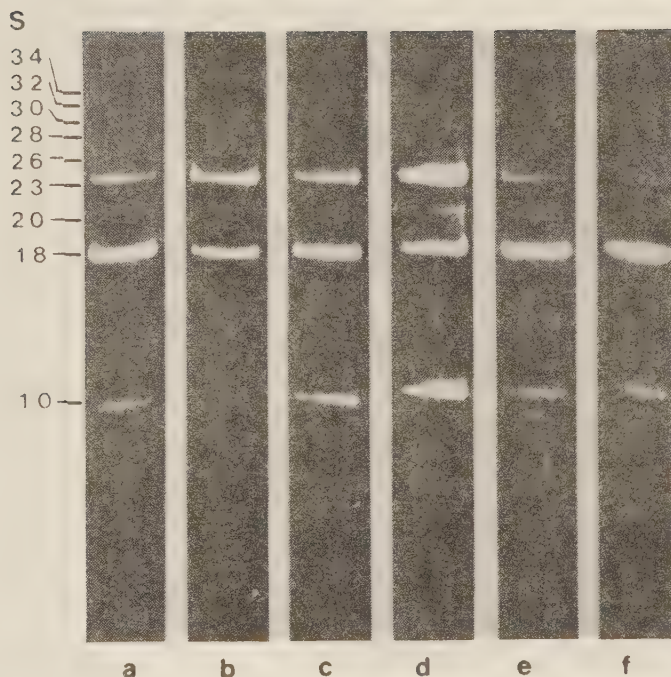


Abb. 16

COB-Transkripte von cob^- -Mutanten aus Exons

Als ^{32}P -mtDNA wurden $\text{rf1} + \text{rf2}$, die die ganze COB-Region abdecken, verwendet.

mtRNA folgender Mutanten wurde elektrophoretisch aufgetrennt und hybridisiert:

a) Wildtyps (zum Vergleich), b) M4901 (α), c) M2011 (β),
d) M5025 (γ), e) M2911 (δ) und f) M1354 (ϵ)

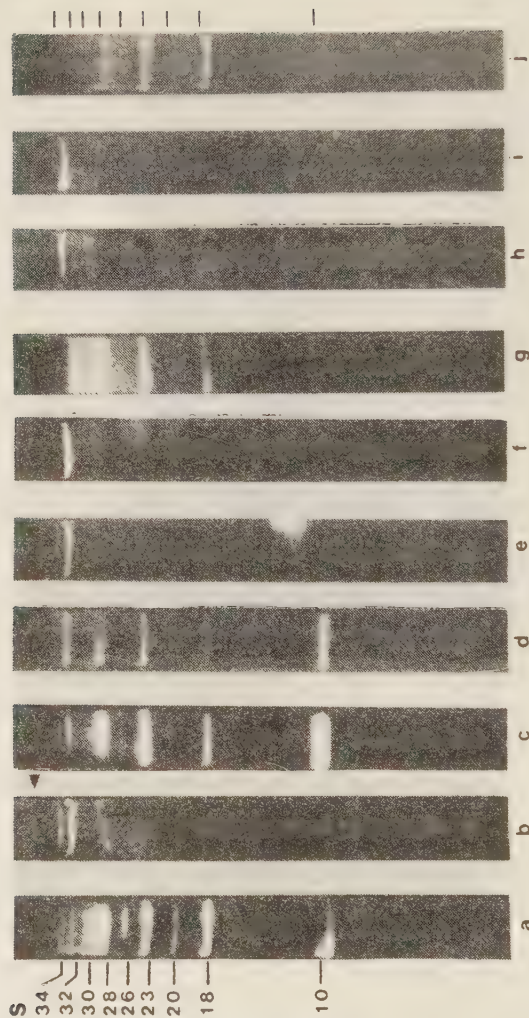


Abb. 17 COB-Transkripte von cob^- -Mutanten aus Exon α

Für die Hybridisierung wurde ^{32}P -mtDNA verwendet, die Sequenzen für die gesamte COB-Region enthielt (rf1 + rf2).

mtRNA folgender cob^- -Mutanten aus Exon α wurde elektrophoretisiert (von links nach rechts in der Reihenfolge der Mutationsorte auf der genetischen Karte).

b) M5020, c) M4205, d) M591, e) M2499, f) M2602, g) M4577, h) M6821, i) M4901
Die Spuren a und j enthalten zum Vergleich mtRNA des Wildtyps.

jedoch nicht in ein funktionsfähiges Protein übersetzt werden kann.

Im Gegensatz zu Mutationen in den Exons β , γ , δ und ϵ scheinen Mutationen in Exon α durchaus einen Einfluss auf das "Processing" zu haben: Von 12 untersuchten Mutanten aus α sind 7 nicht in der Lage, ein korrektes "Processing" durchzuführen (Abb.17 und Tab.5). Sie zeigen ein Transkriptmuster, das dem der Mutanten aus IVS α/β' gleicht, nämlich Akkumulation von 32S-RNA. Ausserdem kann man schwach 10S-RNA und zum Teil 34S-RNA und 28S-RNA erkennen (Abb.17; Spuren b,e und h). Die anderen 5 Mutanten aus α zeigen ein Hybridisierungsmuster, das dem des Wildtyps gleicht, wenn auch 20S-, 26S- und 30S-RNA kaum zu sehen sind (Abb.17; Spuren c,d,g und j; Abb.16, Spur b, und Tab.5). Da die Übergänge von einer zur nächsten Zwischenstufe bei diesen Mutanten im wesentlichen in Schritten von 1300-1400 b erfolgen (32S-28S-23S-18S), kann auf ein frühes Herausschneiden von IVS δ/ϵ (ca. 700 b) geschlossen werden.

Einige Mutanten, die am Anfang von Exon α liegen (vgl. Tab.5 und Abb.6) zeigen eine zusätzliche Hybridisierung mit 38S-RNA (Abb.17, Spur b - Pfeil). Dieser S-Wert entspricht einer geschätzten Länge von mehr als 9500 b. Es erhebt sich daher die Frage, ob es sich bei diesem Transkript um eine RNA-Spezies handelt, die noch nichtprocessierte Sequenzen ausserhalb des kodierenden Bereiches der COB-Region enthält - z.B. nicht-translatierte "leader"-Sequenzen am 3'-Ende von COB - oder um ein Produkt eines inkorrekten "Processing", das noch Teile von Regionen enthält, die in der Nachbarschaft von COB liegen.

2.4 Charakterisierung einer mit⁻-Mutante aus dem "leader"-Bereich der COB-Region: M9410

Bei allen in den vorhergehenden Kapiteln charakterisierten Mutanten handelte es sich um Punktmutanten, die entweder in den kodierenden Bereichen α bis ϵ oder in den dazwischenliegenden IVS kartiert waren. All diesen Mutanten ist gemeinsam, dass die Transkription offenbar nicht gestört ist; der genetische Defekt wirkt sich vielmehr bei einem Teil auf der Ebene des "Processing" des Primärtranskriptes, bei einem anderen Teil auf der Ebene der Funktion oder Synthese des Apocytochrom b aus.

Eine Mutante, die vor Exon α liegend kartiert war, also vermutlich im "leader"-Bereich der COB-Region, zeigte in Vorversuchen ein von den oben genannten abweichendes Verhalten. Sie deuteten darauf hin, dass die Mutation eine Störung der Transkription oder eine Destabilisierung der mRNA bewirkte. Da die Funktion von "leader"-Regionen, die vermutlich auch in der funktionellen mRNA (hier: 18S) enthalten sind, jedoch nicht translatiert werden, bisher weitgehend unklar ist, schien eine detaillierte Charakterisierung dieser Mutante gerade in diesem Zusammenhang interessant.

2.4.1 Genetische und physiologische Charakterisierung der Mutante M9410

Rekombinationsanalysen und rho⁻-Deletionskartierung ergaben, dass es sich bei der Mutation um eine vor dem Exon α liegende Deletion handelte (Daten nicht gezeigt). Tieftemperaturspektren zeigten sowohl bei 558,5 nm (Cytochrom b) als auch bei 603 nm (Cytochrom-c-Oxidase) keine Absorptionsspitzen und damit einen Ausfall dieser beiden Enzyme, d.h., die Mutante verhielt sich pleiotrop (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der mitochondrialen Translationsprodukte durch Markierung mit $^{32}\text{SO}_4^{2-}$ und Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab sowohl einen Ausfall für Apocytochrom b (30 KD) als auch

für Untereinheit I der Cytochrom-C-Oxidase (OXI 3, 40 KD), (Lang, persönliche Mitteilung). Diese Pleiotropie in dem Sinne, dass Mutationen in COB gleichzeitig die Genexpression von OXI 3 stören, ist ebenfalls charakteristisch für Mutanten aus IVS-Bereichen der COB-Region und deutet auf eine Kopplung der Expression dieser beiden Gene hin ("BOX"-Effekt; Pajot et al., 1976; Mahler et al., 1978; Haid et al., 1979).

2.4.2 Physikalische Charakterisierung der mtDNA von M9410 durch Restriktionsanalyse

Um das Ausmass und die Lokalisierung der Deletion auf einer physikalischen Karte bestimmen zu können, wurde eine Restriktionsanalyse der mtDNA mit den Enzymen HinfI und HpaII durchgeführt. Diese ergab, dass die Länge der Deletion 950 bp betrug. Abb.18a zeigt das Ergebniss einer Hybridisierung von mtDNA des Wildtyps (Spur 1) und der Mutante M9410 (Spur 2), geschnitten mit HinfI, mit ³²P-mtDNA, die Sequenzen aus dem Anfangsteil von Exon α und dem Bereich vor der COB-Region besitzt. Man kann auf der Radioautographie deutlich das Fehlen eines HinfI-Fragmentes mit einer Länge von 1200 bp erkennen (Spur 2 vergl. mit Spur 1; Pfeil). Dafür taucht bei der Mutante ein im Vergleich zum Wildtyp neues Fragment auf, das 250 bp lang ist. Daraus kann geschlossen werden, dass dieses durch Verkürzung des Wildtypfragmentes mit einer Länge von 1200 bp um 950 bp entstanden ist. Abb.18b zeigt auf der physikalischen Karte der COB-Region, dass die Deletion im "leader"-Bereich der COB-Region liegt. Da die Gesamtlänge des "leaders" vermutlich zwischen 900-1200 bp beträgt (Grivell et al., 1980), würde dies bedeuten, dass bei M9410 die Deletion zu einem Verlust eines grossen Teils oder der gesamten Sequenz des "leaders" geführt hat.



Abb. 18

Position der Deletionsmutante M9410 auf der physikalischen Karte der COB-Region (Ausschnitt)

- A Radioautographie nach "Southern-Blot": Hybridisierung von HinfI-Fragmenten des Wildtyps (1) und M9410 (2) mit ^{32}P -mtDNA (1700 bp, Frontbereich von COB). Elektrophorese erfolgte auf 1.5%igen Agarosegelen.
- B Lage der Deletion innerhalb der physikalischen Karte auf Grund von Restriktionsdaten. Die Schnittstellen für HinfI (F) wurden von Schweyen et al. (unveröffentlichte Daten) bestimmt. Der schwarze Balken bezeichnet den nicht-deletierten Bereich der mtDNA von M9410, die dünne unterbrochene Linie die Deletion. Die linken bzw. rechten Enden der Deletion liegen innerhalb des weissen Bereichs des Balkens. Die Deletion kann sich bis zu maximal 30 bp in die kodierende Sequenz α erstrecken.

2.4.3 Analyse der Transkripte durch Hybridisierung mit verschiedenen 32 P-mtDNA-Proben

Die Analysen der mtRNA von M9410 durch Hybridisierung mit spezifischen 32 P-mtDNA-Proben sind in Abb.19 dargestellt.

Die Hybridisierung mit 32 P-mtDNA von rho⁻ dD22 zeigt das Auftreten einer 10S- und 12S-RNA, jedoch - im Gegensatz zu allen vorher untersuchten cob⁻-Mutanten - weder des COB-Messengers (18S) noch der Vorstufen (über 18S) (Abb.19, Spur b). Bei dem Signal im hochmolekularen Bereich handelt es sich um Hybridisierung mit mtDNA (Spur b, ●). Wie Spur d in Abb.19 zeigt, verschwindet diese, wenn eine mtDNA-freie RNA-Präparation für die Elektrophorese verwendet wurde. Bei der 12S-RNA-Spezies handelt es sich vermutlich um mRNA der OLI1-Region, da die verwendete mtDNA von rho⁻ dD22 sich insgesamt 3000 bp über die COB-Region hinaus erstreckt und somit wahrscheinlich in OLI 1 hineinragt (Spur a,b; vgl. Abb.1). Dass es sich bei der 10S-RNA tatsächlich um die excisierte IVS α/β 10S handelt, wurde durch eine Hybridisierung mit 32 P-mtDNA aus diesem Bereich (rf 3) bewiesen: Es tritt wiederum ein starkes Signal ausschliesslich mit 10S-RNA auf (Abb.19, Spur e). Die Deletion von M9410 im "leader"-Bereich der COB-Region führt somit zu einer Reduktion der COB-Transkripte, nicht jedoch der 10S-RNA, bis unter die Nachweisgrenze. Dies lässt darauf schliessen, dass Transkription der COB-mtDNA stattfindet und zwar wahrscheinlich mit einer Rate ähnlich der Situation im Wildtyp, denn nur so lässt sich die hohe Konzentration der excisierten 10S-RNA erklären; das Fehlen aller anderen COB-mRNA-Vorstufen könnte dadurch bedingt sein, dass das Primärtranskript nach Excision der 10S-Sequenz aber einem Abbau unterliegt, u.U. deshalb, weil es auf Grund seiner fehlenden "leader"-Region nicht mehr an Ribosomen binden kann.

Während bei Aufzucht von Zellen des Wildtyps in Gegenwart von Chloramphenicol eine Akkumulation von mRNA-Vorstufen eintritt, die wesentlich länger sind, als das COB-Primärtranskript (vgl.

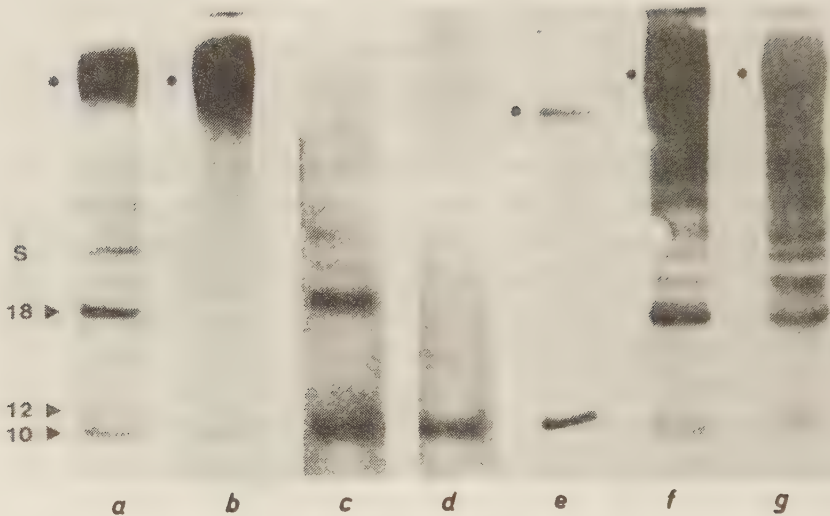


Abb. 19

Untersuchung der Transkripte von M9410 durch Hybridisierung von mtRNA mit spezifischen ^{32}P -mtDNA-Proben

Spuren a und c enthalten zum Vergleich mtRNA des Wildtyps.

Folgende ^{32}P -mtDNA-Proben wurden verwendet:

Spur c, d : rf1 + rf2 (vgl. Abb.10)

Spur a, b : rho⁻ dD22

Spur e : rf3 = IVS / 10S

Spur f, g : RR5 = OXI 3 (vgl. Abb. 2)

Die für die Spuren c und d verwendeten Proben waren DNAase-behandelt.

● : mtDNA

Kap. 2.5), lassen sich diese bei Zellen von M9410, die unter den gleichen Bedingungen gezüchtet wurden, nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Mutation nicht erst die Stabilität des COB-Primärtranskriptes stark verringert, sondern bereits von mRNA-Vorstufen, von denen man auf Grund ihrer Länge annehmen muss, dass sie neben COB-Sequenzen benachbarte Genorte anthalten.

Die Suche nach Mutanten, die wesentlich kürzere Deletionen in diesem Bereich ihrer mtDNA aufweisen, und deren Charakterisierung sollte es möglich machen, über die Bedeutung des "leaders", die im Fall der mRNAs der Eukaryonten und ihrer Mitochondrien bisher weitgehend unklar ist, mehr zu erfahren. So könnte eine Sequenzierung der mtDNA dieser Mutanten darüber Aufschluss geben, welche spezifischen Sequenzen Erkennungssignale für Ribosomenbindung oder vielleicht auch für Regulationsfunktionen auf Transkriptions- bzw. Translationsebene beinhalten (vgl. Minty et al., 1980; Kozak et al., 1980; Ingolia et al., 1980).

Da, wie eingangs erwähnt, M9410 nicht nur für Apocytochrom b sondern auch Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase defizient ist, wurde zusätzlich eine Hybridisierung von mtRNA aus M9410 mit einer ^{32}P -mtDNA-Probe spezifisch für OXI 3 durchgeführt. Diese Untersuchung sollte zeigen, ob die Defizienz für Cytochrom-c-Oxidase durch fehlerhafte Reifung des OXI 3-Messengers bedingt ist. Das OXI 3-Transkriptmuster von M9410 (Abb. 19, Spur g) ist jedoch von dem des Wildtyps nicht unterscheidbar (Spur f), das heisst die Pleiotropie der Mutation in COB wirkt sich offensichtlich nicht auf der Ebene des "Processing" aus. Dagegen führen Mutationen in $\text{IVS } \alpha/\beta$ und $\text{IVS } \gamma/\delta$ sowohl zur Blockierung des "Processing" der COB-, als auch der OXI 3-Region (Van Ommen et al., 1980). In diesem Fall setzt somit der "BOX"-Effekt bereits auf dem Niveau der mRNA-Reifung ein. Offensichtlich beeinflussen Mutationen in COB auf verschiedene Weise - abhängig von deren Lage innerhalb des Genoms - die Expression der OXI 3-Region.

2.5 Untersuchung des Einflusses von Chloramphenicol auf die Reifung der COB-mRNA

Die Beobachtung, dass bei der durch Mutation blockierten Excision einer IVS über das vorangehende Exon hinaus in die IVS translatiert werden kann (Kreike et al., 1979; Solioz und Schatz, 1979; Bechmann et al., 1981), die Entdeckung offener Leserahmen in COB-IVS (Jacq et al., 1980; Nobrega und Tzagoloff, 1980) und die in den vorhergehenden Kapiteln dieser Arbeit beschriebenen Resultate führten zu der Vorstellung, dass ein oder mehrere Genprodukte am "Processing" der mRNAs beteiligt sind (Details siehe Diskussion). Um dies zu überprüfen wurde der Effekt der Hemmung mitochondrialer Proteinsynthese mittels Chloramphenicol auf das "Processing" der COB-Transkripte untersucht.

Chloramphenicol blockiert spezifisch mitochondriale Translation, im Gegensatz zur cytoplasmatischen Proteinsynthese, da es nur mit 70S-, nicht jedoch mit 80S-Ribosomen reagiert. Es bindet an die 50S-Untereinheiten der Ribosomen und bewirkt - vermutlich wie im Falle der Prokaryonten - eine Hemmung der Peptidverknüpfungsreaktion (Grivell et al., 1971). Eine Untersuchung des "Processing" unter dem Einfluss von CAP kann daher Aufschluss darüber geben, ob mitochondriale Translation für ein ungestörtes "Processing" der COB-Region notwendig ist, d.h., ob von mtDNA selbst kodierte Enzyme an der Excision von IVS beteiligt sind.

2.5.1 Einfluss der CAP-Inkubationsdauer auf die Blockierung der mRNA-Reifung des Wildtypstammes 777-3A

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 20 dargestellt. Sie zeigt die Hybridisierungsanalysen von mRNA (777-3A) mit 32 P-mtDNA der COB-Region. Bei Züchtung der Zellen für die RNA-Präparation wurde zu unterschiedlichen Wachstumsphasen Chloramphenicol (4 mg/ml) zugesetzt. Tabelle 6 gibt die jeweilige Inkubationsdauer von CAP an.

Probe Nr.	entspr. Spur in Abb. 20:	bei folgendem Titer wurde CAP zugesetzt:	Einwirkungsdauer von CAP (Zell- generationen):
1	g_{1+2}	5×10^4	10
2	f_{1+2}	6×10^5	6
3	e_{1+2}	$1,8 \times 10^6$	5
4	d_{1+2}	5×10^6	3
5	c_{1+2}	2×10^7	1
6	b_{1+2}	-	-
7 ^a	a_{1+2}	6×10^5	8

Tab. 6

Einwirkungsdauer von Chloramphenicol auf Zellen des Wildtyps 777-3A (vgl. Abb. 20)

Chloramphenicol wurde in einer Konzentration von 4 mg/ml zugesetzt. Die Züchtung der Zellen erfolgte bei 23°C in YGal-Medium und entsprach ansonsten den in Material und Methoden angegebenen Bedingungen.

Die Zellen wurden bei einem Titer von ca. 5×10^7 geerntet.

a) Bei einem Titer von 1×10^7 wurde CAP durch wiederholtes Waschen der Zellen mit CAP-freiem YGal-Medium entfernt.

Diese wurden 2 Generationen lang (ca. 7 Stunden) in frischem Medium ohne CAP weitergezüchtet.

Wie man in Abb.20 (Spuren a-g) sehen kann, führt die Blockierung der mitochondrialen Translation im Wildtyp 777-3A zu einer deutlichen Hemmung der mRNA-Reifung, deren Ausmass von dem Zeitpunkt der CAP-Zugabe abhängt. Wird bei einem Zelltitel von

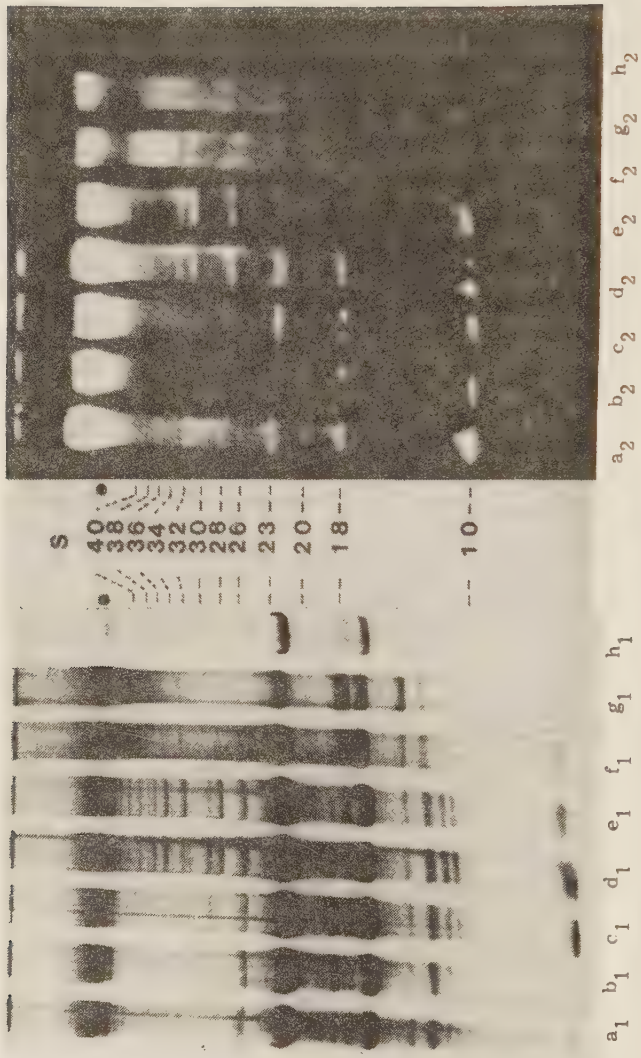


Abb. 20 Einfluss von Chloramphenicol auf die Reifung von COB-Transkripten

Spuren a_1 - h_1 zeigen das EB-gefärbte Agarosegel, Spuren a_2 - h_2 die Radioautographie eines von diesem Gel hergestellten "Northern-Blots", der mit ^{32}P -COB-mtDNA hybridisiert wurde (rf1 + rf2).

Spuren a_1 - g_1 bzw. a_2 - g_2 enthalten mtRNA-Proben des Wildtyps (777-3A); bei Züchtung der Zellen wurde zu unterschiedlichen Titern CAP (4 mg/ml) zugesetzt (vgl. Tab.6).
Spuren h_1 bzw. h_2 enthalten mtRNA von M1301 (IVS α / β 10S) als Referenz, die 34S-RNA akkumuliert.

● : mtDNA

2×10^7 CAP zugesetzt (entsprechend einer Inkubationsdauer von ca. einer Zellverdopplung bei einem Ernte-Titer von 5×10^7), so tritt bereits eine starke Hemmung des "Processing" ein (Abb. 20, Spur c_2 vgl. mit b_2): Während zwar noch ein deutliches Signal für 18S-RNA zu sehen ist, tritt eine Anreicherung von mRNA-Vorstufen (23S- und 28S-RNA) ein. Erhöht man die Einwirkungs-dauer von CAP auf 3 Zellgenerationen (Spur d_2), zeigt sich nicht nur eine Akkumulation von 23S- und 28S-RNA, sondern auch höher-molekularer Vorstufen; dabei sind neben starken Signalen für 32S- und 34S-RNA zusätzlich schwache Banden von 36S-, 38S- und 40S-RNA zu entdecken. Bei einer Einwirkungs-dauer von 5 Zellgenerationen (Spur e_2) verschieben sich die Konzentrationen der einzelnen mRNA-Vorstufen noch weiter zum höhermolekularen Bereich (vgl. mit Spur d_2), d.h., dass die Blockade des "Processing" noch deutlicher hervortritt; 18S-RNA ist nur noch in Spuren vorhanden. Wird CAP schliesslich zu noch früheren Wachstumsphasen (Spur f_2 : 6 Zellgenerationen; Spur g_2 : 10 Generationen) zugesetzt, kann man kein Signal mehr für 18S-RNA entdecken, 23S-, 28S- und 32S-RNA sind in Spuren nachweisbar. Im Bereich von 34S bis 40S findet sich eine sehr diffuse Bande.

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die Reifung der COB-mRNA von einem mitochondrialen Translationsprodukt (mit)abhängig ist. Da in dieser Arbeit 34S-RNA als das primäre Transkript der gesamten COB-Region (α bis $\mathcal{E}$ + "leader") bestimmt worden ist, deuten diese Ergebnisse weiter darauf hin, dass Transkripte gebildet werden können, die länger als die COB-Region sind. Dies gilt ausserdem für einen Teil der Mutanten von Exon α , bei denen es zu einer Akkumulation von 38S-RNA kommt (vgl. Abb. 17), d.h., dass die Transkription vermutlich nicht mit der "leader"-Sequenz der COB-Region (900-1200 bp) startet, sondern Sequenzen mit einschliesst, die der COB-Region benachbart sind (z.B. OLI 1 und OLI 2). Da mit der angewandten Methodik die Längen von Transkripten über 32S nur noch annähernd bestimmt werden können, sind Aussagen über den Anteil von

Sequenzen, die zusätzlich zur "leader"-Region mittranskribiert werden, nicht exakt möglich.

Die Ergebnisse zeigen weiter, dass eine sehr lange Behandlung mit CAP (6-10 Zellgenerationen) das "Processing" dieser "Vor-COB-RNA" zur COB-RNA stört. Es bleibt zu klären, ob es sich bei der unter diesen Bedingungen auftretenden diffusen RNA-Bande im Bereich von 36S - 40S um Produkte eines unspezifisch erfolgenden "Processing" oder u.U. einer unspezifischen Initiation der Transkription handelt, die zu unterschiedlich langen Primärtranskripten führt. Dieser Effekt ist reversibel: Wird CAP bei einem Zelltitert von 6×10^5 zugesetzt, 7 Stunden vor Ernte der Zellen bei einem Titer von 2×10^7 wieder entfernt, führt dies zu einer deutlichen Verringerung der Blockierung des "Processing" (Vgl. Abb.20, Spur f_2 mit a_2) und einem deutlichen Signal für 18S-RNA.

Die Excision von 10S-RNA wird offensichtlich unter Einfluss von CAP nicht blockiert, alle Spuren in Abb.20 zeigen eine Hybridisierung mit dieser RNA-Spezies, wenn auch bei sehr früher CAP-Zugabe etwas vermindert (Spuren f_2 und g_2). Die Vermutung, dass die Excision der 10S-Sequenz von cytoplasmatischen Enzymen katalysiert wird (Jacq et al., 1980) - im Gegensatz zu den anderen IVS der COB-Region - , erfährt durch diese Daten eine weitere Bestätigung.

Dass die Reifungshemmung der COB-mRNA unmittelbare Folge der Unterdrückung mitochondrialer Proteinsynthese ist und nicht durch unspezifische Effekte des CAP hervorgerufen wird, ist durch das in Abb.21, Spur c, gezeigte Experiment bewiesen. Der Wildtypstamm KL 14-4A, der CAP-resistent ist, wurde in Gegenwart von CAP gezüchtet. Die Analyse der mRNAs zeigt, dass das Transkriptmuster der COB-RNA sich kaum von dem unterscheidet, das man unter normalen Wachstumsbedingungen findet und somit keine erkennbare Störung der mRNA-Reifung erfolgte.

2.5.2 Einfluss von CAP auf das "Processing" der mRNA des Wildtypstammes D273-10B

Der Wildtypstamm D273-10B besitzt im Unterschied zu den bisher untersuchten Wildtypstämmen nur IVS γ/δ und IVS δ/ϵ , d.h. die kodierenden Sequenzen α , β und γ sind nicht durch IVS voneinander getrennt (Van Ommen et al., 1979). Die Züchtung dieses Stammes unter Einfluss von CAP ermöglicht daher die Prüfung, ob für die Excision von IVS γ/δ und IVS δ/ϵ - wie für IVS α/β' - ein mitochondriales Protein notwendig ist. Zwar deuten die o.a. Untersuchungen (Abb. 20) darauf hin, dass Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese zur Blockierung der Excision aller IVS ausser IVS α/β 10S führt (Akkumulation von 34S- und 32S-RNA), sie lassen jedoch keine Unterscheidung darüber zu, ob die blockierte Excision von IVS γ/δ (und IVS δ/ϵ) direkte Folge der Translationshemmung ist oder indirekt durch die Blockierung der Eliminierung der vorhergehenden IVS bewirkt wird. Die in Abb. 21 (Spuren a und b) dargestellten Ergebnisse, die eine starke Hemmung des "Processing" von COB-Transkripten des Stammes D273-10 B unter Einfluss von CAP zeigen, unterstützen die Vermutung, dass auch die Excision von IVS γ/δ (und wahrscheinlich IVS δ/ϵ) von mitochondrialer Proteinsynthese abhängig ist:

Das Transkriptmuster der mRNA von Zellen, die ohne CAP gezüchtet wurden, lässt als stärkste Spezies 18S-RNA erkennen neben 20S-RNA (, wobei es sich vermutlich um eine mRNA-Vorstufe handelt, die neben den kodierenden Sequenzen noch IVS δ/ϵ enthält). Höhermolekulare Vorstufen sind mittels der Hybridisierung nicht nachweisbar. (Abb. 21, Spur a). Im Gegensatz dazu zeigt die mRNA von Zellen, die in Gegenwart von 4 mg/ml CAP gezüchtet wurden, eine Reduktion der 18S-RNA und Akkumulation von Vorstufen. Stärkste Hybridisierung tritt mit 23S-RNA und schwächer mit 20S- und 26S-RNA ein (Abb. 21, Spur b). Bei 23S-RNA handelt es sich vermutlich um eine Vorstufe, die zusätzlich zu den kodieren-

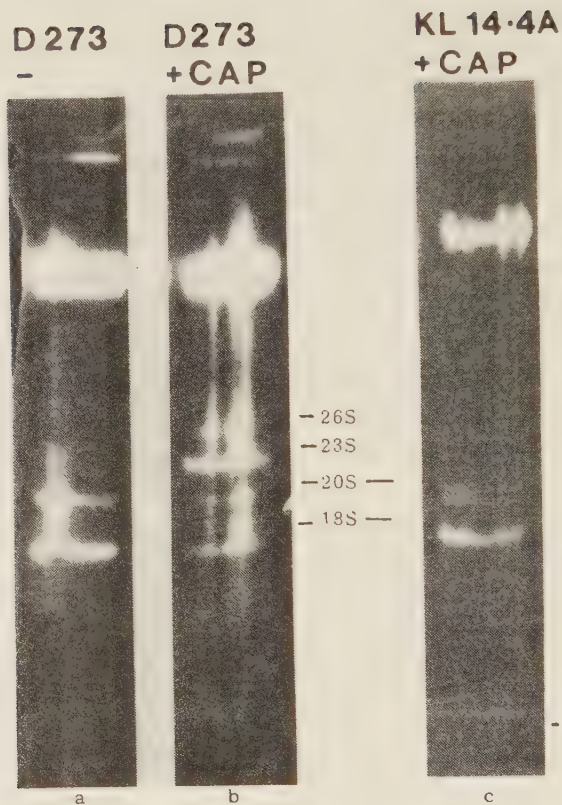


Abb. 21

Einfluss von CAP auf das "Processing" von COB-Transkripten
der Stämme D273-10B und KL 14-4A

Spuren a-c: Radioautographien, ^{32}P -mtDNA: rf1 + rf2 (=Gesamt-COB)

Spuren a,b: mtRNA des Wildtyps D273-10B, der die beiden ersten
IVS nicht enthält.

a: ohne CAP, b: mit CAP (Zugabe bei einem Titer
von 2×10^6)

Spur c : mtRNA des Wildtyps KL 14-4A, der CAP-resistent ist.
(Zugabe von CAP bei einem Titer von 2×10^6)

Züchtung der Zellen erfolgte bei 23°C in YGal-Medium.

den Sequenzen IVS γ/δ enthält (Länge von 23S-RNA: 3600 b $\hat{=}$ IVS γ/δ (1400 b) + 18S-RNA (2200 b)), während 26S-RNA vermutlich noch sowohl IVS γ/δ als auch IVS δ/ϵ besitzt (Länge von 26S-RNA: 4200 b $\hat{=}$ IVS γ/δ (1400 b) + IVS δ/ϵ (ca. 600 b) + 18S-RNA (2200 b)). Beide Radioautographien lassen ausserdem schwache Hybridisierungen mit 16S-RNA erkennen, wobei es sich vermutlich um excisierte IVS handelt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese mit Chloramphenicol zu einer deutlichen Blockierung der Reifungsschritte der mRNAs führt, wie es auf Grund oben erwähnter Hypothesen zu erwarten war (siehe auch Diskussion). Kurze bis mittlere CAP-Inkubationszeiten (1-5 Zellgenerationen) führen in 777-3A zu einer Blockierung analog der Situation in Mutanten aus IVS α/β' , d.h., zur Akkumulation von Vorstufen (hauptsächlich 32S- und 34S-RNA), die noch alle IVS ausser IVS α'/β 10S (und vermutlich auch IVS δ/ϵ) enthalten. Längere Inkubationszeiten (6-10 Zellgenerationen) blockieren frühere Stufen des "Processing", die wahrscheinlich nicht die Excision der COB-IVS sondern von Sequenzen ausserhalb der COB-Region betreffen. Diese beiden Befunde liessen sich durch einen zweistufigen "Processing"-Mechanismus erklären, der durch die Beteiligung zweier mitochondrial synthetisierter Proteine mit unterschiedlichem Turnover charakterisiert ist: Während das langlebigere Protein an dem "Processing" eines hochmolekularen Transkriptes (über 34S) beteiligt ist, das u.U. an COB angrenzende Gene zusätzlich noch enthält, würde die Funktion des (oder der) kurzlebigen die Excision aller COB-interner IVS ausser IVS α'/β 10S (und evtl. IVS δ/ϵ) betreffen.

IV. DISKUSSION

Studien über die Reifung von Transkripten der COB-Region schienen zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen aus mehreren Gründen interessant und erfolgversprechend:

- i) die COB-Region enthält - im Gegensatz zu manchen Genen der Kern-DNA - nur wenige Introns, die relativ lang sind. Es bot sich daher die Möglichkeit, IVS-spezifische mtDNA-Bereiche zu charakterisieren und für Hybridisierungsstudien erforderliche Proben mit IVS-Sequenzen zu gewinnen,
- ii) zahlreiche Mutationen sind in IVS kartiert worden. Ihre Wirkung auf die Expression mitochondrialer Proteine gab Anlass zu der Vermutung, dass sie durch die Störung der Excision von IVS die Bildung der mRNA für Apocytochrom b blockieren. Die Untersuchung der Transkripte der COB-Region bot daher die Aussicht darauf, Zwischenstufen des "Processing" auf Grund ihrer mutativ bedingten Akkumulation erfassen zu können.

1 - Genetisch/physikalische Feinstrukturkarte der COB-Region

Die Erstellung einer physikalischen Karte der COB-Region war Vorbedingung für Transkriptstudien. Dazu wurden Restriktionsanalysen von verschiedenen rho⁻-Klonen durchgeführt. Diese eigneten sich dafür aus mehreren Gründen: i) Sie enthalten nur noch bestimmte Sequenzen der mtDNA der Wildtyp-COB-Region, deren Lage auf der genetischen Karte dieser Region bekannt ist (Bechmann et al., 1981) und gestatten daher zusammen mit Restriktionsanalysen eine Korrelation der genetischen und der physikalischen Genkarte, ii) die von ihnen zurückbehaltene Sequenz liegt, abhängig von ihrer Länge, mehrfach reiteriert vor. Sie stellen somit ein natürliches Klonierungssystem dar, das es erlaubt, bestimmte mtDNA-Sequenzen mittels Restriktion in einer Menge zu gewinnen, die eine weitere Anreicherung durch Klonierung in Plasmiden überflüssig macht, (z.B. für radioaktive Markierungen in vitro).

Die in dieser Arbeit durch Restriktionsanalysen charakterisierten rho⁻-Stämme und deren Lagebestimmung auf der physikalischen Karte der mtDNA der COB-Region erlaubten es, zusammen mit weiteren, von Slonimski et al. (1978a) kartierten rho⁻-Stämmen und in Zusammenarbeit mit G.Grosch, eine genetisch/physikalische Feinstrukturkarte der COB-Region zu erstellen. Diese gibt Positionen und Längen der für Apocytochrom b kodierenden sowie den dazwischenliegenden Sequenzen (IVS) im mitochondrialen Genom wieder. Bechmann et al. (1981) haben fünf solcher kodierenden Sequenzen (α , β , γ , δ und ϵ) identifiziert und aus genetisch/proteinchemischen Ergebnissen die Grössen dieser Sequenzen abgeschätzt, indem sie die Längendifferenzen der durch non-sense Mutationen bedingten Apocytochrom b-Fragmente mit der genetischen Karte in Bezug setzten.

Die in dieser Arbeit an Hand der Restriktionsanalysen ermittelten physikalischen Längen der kodierenden Sequenzen stehen mit diesen Schätzungen in gutem Einklang. Die (Maximal-)längen der kodierenden Sequenzen betragen: 1200-1500 bp (α), weniger als 200 bp (β), 700 bp (γ), weniger als 200 bp (δ) und 1000 bp (ϵ). Für die IVS wurden folgende (Mindest-)längen ermittelt: 1900 bp (IVS α / β), 1400 bp (IVS β / γ), 1400 bp (IVS γ / δ) und 350 bp (IVS δ / ϵ).

Genauere Angaben sind mit der in dieser Arbeit angewandten Methodik nicht möglich. Deren Auflösung ist begrenzt durch: i) Die Genauigkeit der Molekulargewichtsbestimmung von Restriktionsfragmenten in Agarosegelen, die vor allem im hochmolekularen Bereich schwierig ist, ii) die Positionen von Restriktionsschnitten und iii) die Verfügbarkeit einer Serie von rho⁻-Klonen, deren zurückbehaltene Sequenz dicht an den Grenzen kodierender Sequenzen endet und damit eine hohe Auflösung gestattet; solche rho⁻-Klone konnten in der kleinen zur Verfügung stehenden Serie und innerhalb des vertretbaren Aufwands für Analysen der rho⁻-mtDNAs nicht für alle Grenzbereiche gefunden werden.

Die Genauigkeit der vorliegenden Karte erwies sich jedoch als

ausreichend für die im 2. Teil der Arbeit durchgeführten Experimente. Sie bestätigen und erweitern die in einer früheren Arbeit von Slonimski et al. (1978a) begonnene Lokalisierung von α (in deren Nomenklatur: $\triangleq$ box 4/5), γ ($\triangleq$ box 1) und ϵ ($\triangleq$ box 6). Positionen und Längen von kodierenden Bereichen, die durch EM-hybridisierungsstudien zwischen COB-mRNA und mtDNA bestimmt wurden (Grivell et al., 1979), stehen ebenfalls in gutem Einklang mit den hier gezeigten Daten (mit Ausnahme kleinerer, β , δ und ϵ betreffender Abweichungen) und mit den nach Fertigstellung dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen von Teilbereichen der COB-Region (Tzagoloff et al., 1980; Lazowska et al., 1980).

Nach Kenntnis der Länge von Exons und IVS ist es von Interesse, die Verteilung der zahlreichen bisher der COB-Region zugeordneten Mutationen innerhalb verschiedener Sequenzen zu prüfen. Während ihre Anzahl in kodierenden Sequenzen etwa proportional ist zur Länge der Sequenz und innerhalb dieser die Mutationsorte gleichmässig verteilt zu sein scheinen (ca. 8 pro 100 bp), sind die Verhältnisse in IVS anders: In IVS δ / ϵ (mind. 350 bp) wurden bisher keine Mutationen gefunden, in IVS β / γ (mind. 1400 bp) nur wenige, die zudem alle an einem Ende, dem β -proximalen, liegen. Dagegen sind Mutationen in IVS α / β (mind. 1900 bp) und in IVS γ / δ (mind. 1400 bp) häufiger. Vor allem die Zahl der in IVS α / β liegenden, die sich in insgesamt 9 verschiedenen Klustern, verteilt über die gesamte IVS, ordnen lassen, liegt in einer Grössenordnung, die derjenigen nahekommt, die für die Gesamtzahl der für Apocytochrom b kodierenden Sequenzen gefunden wurde. Die unterschiedliche Anzahl und Verteilung der Mutationen innerhalb der IVS deutet darauf hin, dass den einzelnen IVS unter Umständen auch eine unterschiedliche Bedeutung zukommt. Darauf wird im zweiten Teil der Diskussion näher eingegangen werden.

2 - Reifungsschritte von COB-Transkripten im Wildtyp und in Mutanten aus verschiedenen Bereichen der COB-Region.

Bisherige Untersuchungen wie Kartierung von Transkripten der mtDNA, Elektronenmikroskopie und genetische Analysen hatten zwar den Beweis dafür erbracht, dass die COB-Region für Apocytochrom b kodiert und aus insgesamt mindestens 5, durch IVS getrennte, kodierenden Regionen besteht, jedoch noch keine Aussagen über Reifungsschritte der mRNA-Vorstufen zum funktionellen Messenger ermöglicht (Slonimski et al., 1978; Grivell et al., 1979; Van Ommen et al., 1979; Bechmann et al., 1981). In Analogie zur Situation bei eukaryontischen Genen des Zellkerns lag es nahe, auch für mtDNA und damit für die COB-Region ein "Processing" nach folgendem Schema anzunehmen: Aus einem sehr langen, primären Transkript (bei COB: ca. 8000 b entspr. der Länge COB-mtDNA) werden IVS nacheinander herausgeschnitten und gleichzeitig die freien Enden der kodierenden Bereiche wieder ligiert ("cut-and-splice"). Die fertige mRNA enthält lediglich kodierende Bereiche und nichttranslatierte Enden.

"Processing" der COB-mRNA im Wildtyp

In Weiterführung einleitender Untersuchungen von G. Grosch (Dissertation, 1980) und in guter Übereinstimmung mit einer neueren Arbeit von Van Ommen et al. (1980) zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Messenger der COB-Region eine 18S-RNA ($\approx$ 2200 b) ist, die nach einer Reihe von Reifungsschritten aus einem primären Transkript gebildet wird.

Die Nachweismethode bestand darin, dass COB-mRNA-Vorstufen durch Hybridisierung mit spezifischen 32 P-mtDNA-Proben bestimmt wurden. Die Identifizierung der 18S-RNA als Endprodukt des "Processing" und damit des funktionellen Messengers beruhte auf dessen Eigenschaft, nicht mit IVS-mtDNA zu hybridisieren, während das Vorhandensein einer IVS in einem bestimmten Transkript durch dessen Fähigkeit, mit einer IVS-spezifischen mtDNA-Probe zu

hybridisieren, ermittelt wurde und damit die Zusammensetzung und relative Konzentration von mRNA-Vorstufen aufgeklärt werden konnte.

In fünf Einzelschritten werden IVS excisiert und die kodierenden Regionen ligiert, sodass schliesslich α , β , γ , δ und ϵ aneinandergeschlossen sind. Drei der vier IVS werden in jeweils einem einzigen Schritt herausgeschnitten (IVS β/γ , IVS γ/δ und IVS δ/ϵ), während IVS α/β in zwei, zeitlich voneinander unabhängigen Schritten excisiert wird.

Bei einer völlig zufälligen Excision der einzelnen IVS ergäbe sich auf Grund deren unterschiedlicher Länge eine statistische Verteilung aller mathematisch möglichen Kombinationen und damit kein erkennbares Muster an RNA-Banden nach Elektrophorese und Radioautographie. Das Studium der Transkripte im Wildtyp mit dem Auftreten diskreter COB-RNA-Banden zeigt, dass es zwar keine strenge Reihenfolge in der Excision einzelner IVS gibt, jedoch bestimmte IVS bevorzugt vor anderen entfernt werden. Das gilt vor allem für IVS α/β 10S, dem α -proximalen Teil von IVS α/β , die bevorzugt sehr früh eliminiert wird.

Das in Abb.12 dargestellte Excisionsschema zeigt den bevorzugten Reifungsweg (Doppelpfeile) und seltener vorkommende Seitenwege: Als erster Schritt erfolgt die Excision eines Teils von IVS α/β , IVS α/β 10S (ca. 700 b): Diese Sequenz ist im Wildtyp nur als die excisierte 10S-RNA, jedoch in keiner Vorstufe erkennbar. Der Beweis dafür, dass 10S-RNA Teil einer mRNA-Vorstufe (34S) ist, war nur durch Untersuchungen der mtRNA von Mutanten möglich, die nicht mehr in der Lage waren, diese Sequenz zu excisieren, und die Vorstufen akkumulierten (vgl. Abb.13 und 14). Interessanterweise ist 10S-RNA im Gegensatz zu allen anderen excisierten IVS im "Northern-Blot" gut nachweisbar, d.h. wesentlich stabiler als diese. Dass dies wahrscheinlich durch eine Zirkularisierung des 10S-Moleküls erreicht wird, ist durch eine neuere Arbeit von Halbreich et al. (1980) an Hand von EM-Aufnahmen gezeigt. Nach Excision der 10S-Sequenz gibt es zwei Hauptwege für Excision der

weiteren IVS, die sich in dem Schritt, der IVS δ/ϵ eliminiert, unterscheiden. Die möglichen Aufeinanderfolgen an Excisions-schritten führen schliesslich alle zu einer 18S-RNA, dem funktionellen Messenger für Apocytochrom b. Ob die 34S-RNA, die noch alle IVS enthält, tatsächlich das 1. Transkript ist oder das Ergebnis von vorausgegangenen Reifungsprozessen ausserhalb von α und ϵ , kann hier nicht beantwortet werden (vgl. letzten Teil der Diskussion).

Bei den vorangegangenen Ausführungen ist zu beachten, dass nur die experimentell nachweisbaren Reifungswege wiedergegeben sind, d.h. diejenigen, die von einem grösseren Anteil der RNA-Moleküle durchlaufen werden. Die Möglichkeit anderer Reihenfolgen der "Processing"-Schritte, durchlaufen von geringen Anteilen der COB-Transkriptmoleküle, kann nicht ausgeschlossen werden (siehe weiter unten). Zur Erklärung der Bevorzugung bestimmter Folgen an Reifungsschritten vor anderen genügt die Annahme unterschiedlicher Kinetiken für die Excision der verschiedenen IVS. Diese Unterschiede können durch die dreidimensionale Struktur des langen primären COB-Transkriptes oder durch unterschiedliche Excisionssequenzen der einzelnen IVS bedingt sein. Ersteres würde z.B. erklären, dass IVS δ/ϵ bevorzugt entweder vor oder nach Excision von IVS β/γ , IVS γ/δ und IVS α/β' eliminiert wird: Transkripte, die entweder alle diese IVS noch oder nicht mehr besitzen, mögen die zur Excision von IVS δ/ϵ günstige Konformation aufweisen.

Einfluss von Mutationen in intervenierenden und kodierenden Sequenzen auf das "Processing" der COB-Transkripte

Die Frage, auf welcher Ebene sich Mutationen in IVS auswirken, war bisher unbeantwortet. Denkbar wären Wirkungen wie:

- i) vorzeitige Termination der Transkription in einer der mutierten IVS und daraus resultierend die Bildung von Transkript-Fragmenten,
- ii) fehlerhaftes "Processing", das zu untypischen RNA-Molekülen führt, die möglicherweise einem vorzeitigen Abbau unterliegen,
- iii) Blockierung des "Processing", resultierend in der Akkumulation

von RNA-Zwischenstufen, wie dies nach dem Studium der in IVS-Mutanten gebildeten mitochondrialen Proteine vermutet wurde (Kreike et al., 1979; Solioz und Schatz, 1979).

Während die Untersuchung einer Deletionsmutante aus dem "leader"-Bereich der COB-Region (M9410) zeigte, dass die Mutation zu einem Verlust des COB-Messengers und aller Vorstufen führt und damit auf eine Wirkung hinweist, wie sie unter Punkt ii) geschildert wurde, zeigen die an Hand der IVS-Mutanten erhaltenen Befunde, dass diese sich grundsätzlich durch eine Blockierung des "Processing" auswirken, wodurch eine Anreicherung von RNA-Vorstufen eintritt, die im Wildtyp nur in geringen Spuren vorkommen. Dies entspricht einer wie in Punkt iii) dargestellten Situation.

Das Transkriptmuster der IVS-Mutanten unterscheidet sich völlig von dem des Wildtyps. Es ist für jede IVS verschieden, Mutanten der gleichen IVS haben jedoch im wesentlichen das gleiche Muster; (in IVS α / β kann man zwei Gruppen von Transkriptmustern erkennen, entsprechend der Lokalisation der Mutation in IVS α / β 10S oder IVS α / β'). Allen Mutanten ist gemeinsam, dass sie i) keine 18S-RNA mehr erkennen lassen und ii) in der Excision der durch Mutation veränderten IVS immer defekt sind; meistens sind auch Excisionen weiterer IVS gestört.

Für jede der vier untersuchten IVS finden sich Beispiele von Mutanten, die nur in der Excision der mutierten IVS völlig defekt sind, andere IVS aber excisieren können (z. B. M4873 in IVS α / β 10S, M4942 in IVS α / β' , Abb. 15; M811 in IVS β / γ , M4359 in IVS γ / δ , Abb. 13). Dabei folgt das "Processing" einer der in Abb. 12 für den Wildtyp gefundenen Reihenfolgen unter "Umgehung" des jeweiligen Excisionsblocks, wenn auch zum Teil im Vergleich zum Wildtyp verzögert. Diese Befunde gelten auch für IVS α / β 10S, deren Excision im Wildtyp als frühester Schritt erfolgt. Es scheint somit, dass bei den o. a. Mutanten das Schema der Excisionsfolge recht flexibel ist: Die blockierte Excision der mutierten IVS verhindert nicht die Eliminierung der in den Reifungswegen in Abb. 12

dargestellten nachfolgenden IVS. D.h., dass die Excision einer IVS nicht eine bestimmte RNA-Struktur erfordert, die erst nach Herausschneiden einer bestimmten anderen IVS erreicht würde.

In scheinbarem Gegensatz dazu stehen Befunde, die sich aus Untersuchungen von Mutanten ergaben, bei denen die Mutation in einer IVS die gleichzeitige Blockierung der Eliminierung auch anderer IVS bewirkt (vgl. Abb.13 und Tab.5), wobei polare Effekte zu beobachten sind: In Transkriptionsrichtung, also 5'-3'-Richtung folgende IVS werden nicht excisiert (ausser IVS δ/ϵ) (Tab. 7).

Mutation in IVS	Excision von IVS			
	α/β_{10S}	α/β'	β/γ	γ/δ
α/β_{10S}	-	-	-	-
α/β'	+	-	-	-
β/γ	+	+	-	-
γ/δ	+	+	+	-

Tab. 7 Polarer Effekt von Mutationen in IVS

Mutanten in IVS α/β_{10S} akkumulieren eine 34S-RNA-Spezies, die noch alle IVS enthält. Mutanten in IVS α/β' reichern eine 32S-RNA an, können jedoch die vor dem Mutationsort liegende 10S-Sequenz excisieren. Der Schritt von 34S zu 32S zeigt die Excision von 10S-RNA (und IVS δ/ϵ) an. Mutanten in IVS β/γ akkumulieren 28S-RNA (neben etwas 24S-RNA), eine mRNA-Vorstufe, die (auf Grund ihrer Länge und durch die Ergebnisse der Hybridisierung mit IVS-³²P-mtDNA) noch IVS β/γ und IVS γ/δ enthält. Schliesslich akkumulieren Mutanten aus IVS γ/δ 23S-RNA; diese enthält nur noch IVS γ/δ selbst neben den kodierenden Sequenzen.

Dieser polare Effekt gibt Anlass zu der Annahme, dass das Reifen der COB-Transkripte an eine bestimmte Reihenfolge an Excisionsschritten gebunden ist und dass die Entfernung einer bestimmten

IVS erst möglich wird, wenn die in 5' -3' -Richtung davorgelegenen IVS bereits herausgeschnitten sind. Dieser obligate Reifungsweg, der nur an Hand der IVS-Mutanten erstellt werden konnte, ist in Abb.22B dargestellt. Er unterscheidet sich von dem in Abb.12 und Abb.20A gezeigten Hauptweg, wie er in Wildtypmitochondrien vorkommt, in mehreren Punkten, insbesondere in dem Zeitpunkt der Excision von IVS α / β' , (ein später Schritt im Wildtyp, ein früher Schritt in den o.a. Mutanten).

Mutanten aus den kodierenden Regionen β , γ , δ , ϵ und zum Teil α zeigen ein Transkriptmuster, das dem des Wildtyps entspricht und eine 18S-RNA erkennen lässt (Abb.16). Dies ist in Einklang mit der Vorstellung, dass Mutationen in kodierenden Bereichen auf der Ebene der Translation wirken, d.h. zu Kettenabbruch oder Aminosäureaustauschen in Apocytochrom b führen (Haid et al., 1979).

Bei den o.a. Reifungswegen der COB-Transkripte taucht ein offensichtlicher Widerspruch auf: Während das Studium der Reifung des Messengers im Wildtyp zwar bevorzugte, keineswegs aber starre, obligatorische Reihenfolgen erkennen liess, legt der mittels der IVS-Mutanten erstellte Reifungsweg eine gegenteilige Annahme nahe; demnach muss eine starre Reihenfolge eingehalten werden: Blockierung der Excision einer IVS durch Mutation führt dazu, dass in 5'-3'-Richtung nachfolgende IVS ebenfalls nicht excisiert werden können. Wie lassen sich nun beide Vorstellungen in Einklang bringen ?

Abhängigkeit des "Processing" von mitochondrial synthetisierten Proteinen

Mittels Mutationen in IVS, die die Erstellung des o.a. Reifungsweges ermöglichten, konnte schon früher der Beweis erbracht werden, dass IVS in der COB-Region auf die Weise translatiert werden können, dass über das vorangehende Exon hinaus in die IVS weitergelesen wird (Kreike et al., 1979; Solioz und Schatz,

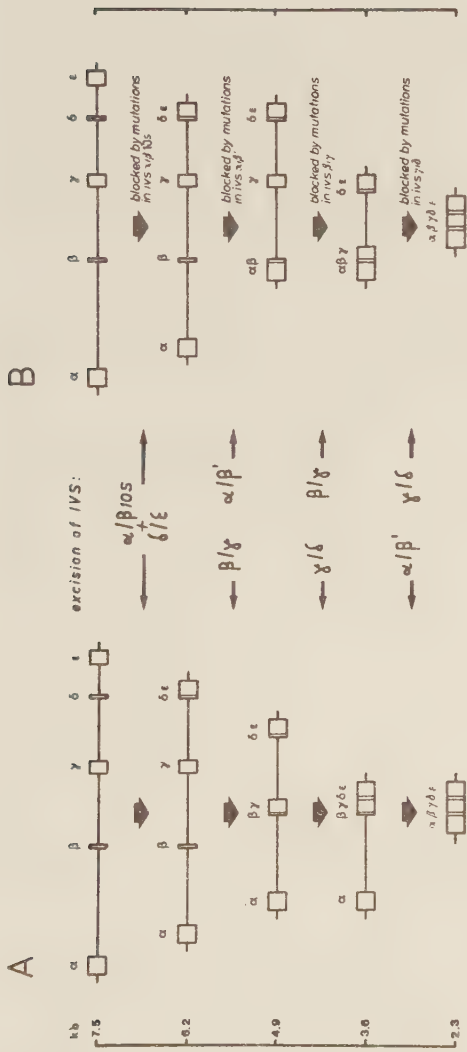


Abb. 22 Schematische Darstellung des bevorzugten Reifungsweges im Wildtyp (A) und des obligatorischen, an wenigen RNA-Molekülen vorkommenden Reifungsweges (B)

Die Blöcke stellen kodierende Bereiche dar, die Striche dazwischen IVS. IVS α/β 10S bezeichnet den α -proximalen, IVS α/β' den α -distalen Teil der Gesamt-IVS α/β . In Gegenwart eines vollständig funktionierenden "Processing"-Apparates wird Reifungsweg A vor anderen bevorzugt, die dabei auftretenden mRNA-Zwischenstufen sind im Wildtyp nachweisbar (vgl. Abb. 11 u. 12). Reifungsweg B wird nur von einigen wenigen der COB-Transkripte befolgt. Mutationen in IVS blockieren Excisionsschritte und führen zur Akkumulation von Vorstufen(B). Von den in Reifungsweg B entstehenden mRNA-Zwischenstufen wird angenommen, dass sie in geringen Mengen synthetisiert werden und Transkripte darstellen, an denen Komponenten des "Processing"-Apparates synthetisiert werden (vgl. Diskussion).

1979; Alexander et al., 1980; Bechmann et al., 1981). Die in jüngster Zeit durchgeführten Sequenzanalysen zeigen, dass in IVS α / β' und IVS γ / δ tatsächlich lange offene Leserahmen sind, also Bereiche, die für ein Protein kodieren können (Jacq et al., 1980; Nobrega und Tzagoloff, 1980). Von diesen Befunden ausgehend wurde die Hypothese entwickelt, dass in Exons+IVS kodierte Proteine ("read-through-proteins"), die an den mRNA-Vorstufen für Apocytochrom b translatiert werden, für das Reifen des COB-Messengers nötig sind (Kreike et al., 1979; Jacq et al., 1980). Das bedeutet, dass das Strukturgen COB selbst zusätzlich die Information für Produkte enthält, die für sein "Processing" erforderlich sind. Es gibt inzwischen experimentelle Beweise, dass zumindest in IVS α / β' ein Protein kodiert ist: Analysen von Translationsprodukten vieler Mutanten aus IVS α / β' , die die Akkumulation von mRNA mit einer Länge von 6,2 kb bewirken, haben gezeigt, dass sie offensichtlich zu Kettenabbruch in einem Protein führen, dessen Länge im WT 42 KD beträgt und durch Translation von Exon α + IVS α / β' gebildet wird (Bechmann et al., 1981). Slonimski und Mitarbeiter (1980) konnten an Hand von Sequenzanalysen zeigen, dass Mutanten, die zu Kettenabbruch dieses Proteins führen, tatsächlich in IVS α / β' im Gegensatz zum Wildtyp Stop-Kodons enthalten, deren Position gut mit der Länge des verkürzten Proteins korreliert. Einige weitere Beobachtungen dieser Arbeitsgruppe stützen die Annahme eines in α + α / β' kodierten "Processing"-Enzyms (Dujardin et al., 1980).

In Fortführung der Modelle, die von Jacq et al. (1980) und Church und Gilbert (1980) aufgestellt wurden, lässt sich an Hand der Ergebnisse dieser Arbeit annehmen, dass:

- i) die Excision der 10S-Sequenz Voraussetzung ist für die Synthese eines Proteins, das an den dann fusionierten Sequenzen α + α / β' translatiert wird und
- ii) dieses Protein als "Processing"-Enzym ("Maturase" oder "Spligase") für IVS α / β' fungiert.

Dieser Mechanismus würde zu einem biologischen Regelkreis, einer Autoregulation, führen: Das Enzym excisiert und zerstört damit seinen eigenen Messenger. Eine Reduktion seiner Aktivität würde dies verzögern und damit wiederum seine vermehrte Translation erwirken. Die vollständige Blockierung der Excision von 10S-RNA bei Mutanten wie M1301 und G5049 führt dazu, dass der Messenger für das "Processing"-Enzym fehlt. In den "leaky"-Mutanten, wie M4873, scheint die Excision der 10S-Sequenz noch in einigen Molekülen möglich zu sein, die dann als Messenger für das "Processing"-Enzym dienen und die Translation von Spuren dieses Enzyms noch erlauben; dies reicht aus, um weitere Reifungsschritte - wenn auch stark reduziert - auszulösen (vgl. Abb.15). Mutationen in $IVS \alpha / \beta'$, also innerhalb der für dieses Protein kodierenden Sequenz, führen zu einem funktionslosen Produkt und blockieren damit die Excision von $IVS \alpha / \beta'$ und weiterer IVS. Die Tatsache, dass Mutationen in α den gleichen Effekt haben können, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass dieses Enzym durch Translation der fusionierten Sequenzen $\alpha + \alpha / \beta'$ gebildet wird.

Wie in Reifungsweg B (Abb.22) gezeigt, folgt der Excision von $IVS \alpha / \beta'$ die von $IVS \beta / \gamma$, an die sich die Excision von $IVS \gamma / \delta$ anschliesst. Diese Polarität in dem Sinne, dass die Excisionsschritte in Translationsrichtung stattfinden, könnte darauf hindeuten, dass - wie es von Church und Gilbert (1980) diskutiert wird - die Expression von $IVS \beta / \gamma$ und $IVS \gamma / \delta$ und deren Excision in ähnlicher Weise geschieht wie bei $IVS \alpha / \beta'$. Die jeweiligen "Maturasen II und III" würden an der mRNA mit den fusionierten Sequenzen $\alpha + \beta + \beta / \gamma$ (4.9 kb-RNA) bzw. $\alpha + \beta + \gamma + \gamma / \delta$ (3.6 kb-RNA) synthetisiert. Andererseits wäre denkbar, dass durch jede Excision ein Produkt erzeugt wird, das an der Excision der jeweils nachfolgenden IVS in Form einer "guide"-RNA beteiligt ist. Zumindest bei dem "Processing" von Mosaikgenen des Zellkerns der Eukaryonten scheinen solche "guide"-RNAs be-

teiligt zu sein. Die Funktion dieser snRNAs (= small nuclear RNA) besteht wahrscheinlich darin, dass sie die beiden Enden der IVS durch Basenpaarung (6-10 bp) verbinden; die dann entstehende Schleife ermöglicht deren enzymatische Erkennung und Excision (Murray und Holliday, 1979; Lerner, 1980). Ob dies bei Mitochondrien ähnlich ist und ob eventuell die 10S-RNA eine "guide"-Funktion haben kann, ist bisher eine offene Frage.

Mit beiden Hypothesen, dem "Maturase"- und dem "guide"-RNA"-Modell, lässt sich die oben erwähnte scheinbare Diskrepanz zwischen den beiden Reifungswegen A und B (Abb.22) lösen: Nachdem in wenigen RNA-Molekülen die für die Excision der IVS nötigen Produkte, Proteine oder RNAs, gebildet wurden (B), können diese als diffusible Produkte nicht nur auf das Transkriptmolekül, an dem sie synthetisiert wurden, sondern auch auf weitere Moleküle einwirken. Dadurch stellt sich schliesslich ein Fließgleichgewicht ein, das zu dem Hauptreifungsweg führt, wie er in Abb.12 und Abb.22A gezeigt ist. Reifungsweg B lässt sich, da er eben nur an wenigen RNA-Molekülen abläuft, durch die Analyse der Transkripte des Wildtyps nicht nachweisen.

Diese Hypothesen sind auch in Einklang mit der Beobachtung von polaren Effekten des Reifungsweges, nämlich dass Mutationen in einer IVS deren Excision und die der in Translationsrichtung darauffolgenden IVS blockieren; und sie erklären die Tatsache, dass trotz der starken Reduktion der Excision von IVS α/β in den "leaky"-Mutanten M4873 und M4942 noch eine ausreichende Synthese von Produkten möglich ist, die dann die Eliminierung der anderen IVS gestattet. Die Hypothese, dass IVS-kodierte Produkte für das "Processing" der COB-RNA notwendig sind, wird auch durch Komplementationstests bestätigt: Eine Mutation in einer kodierenden Sequenz und eine Mutation in einer IVS in trans-Position führen zur Rekonstitution mitochondrialer Funktion (Slonimski et al., 1978; Haid et al., 1979; Lamouroux, 1979). Dies gilt nur für den Fall, dass "Processing"-Enzyme ausschliesslich in IVS-Sequenzen kodiert sind; Mutationen in Exon α und Mutationen in IVS α/β' können nicht

komplementieren, was in Übereinstimmung ist mit der Vorstellung, dass $\alpha + \alpha / \beta'$ gemeinsam Maturase I kodieren (Jacq et al., 1980; Bechmann et al., 1981).

Von den beiden Hypothesen ("Maturase" - oder "guide"- Modell) steht nur die erstere in Einklang mit den Beobachtungen, dass i) Translation über die Exons hinaus in IVS β / γ und IVS γ / δ stattfinden kann (Bechmann et al., 1981; Alexander et al., 1980), ii) IVS γ / δ einen langen offenen Leserahmen enthält, der in Phase ist mit den vorangehenden Exons α bis β , und iii) Mutationen in IVS α / β' , die vorzeitige Termination des 42 KD-Proteins bedingen, durch Paromomycin phänotypisch supprimiert werden können (Dujardin et al., 1980). Falls jedoch - entsprechend der IVS α / β' - auch die anderen IVS funktionelle Proteine kodieren, sollte man innerhalb dieser ähnlich viele Mutationen finden wie in IVS α / β' . Dies ist jedoch nicht der Fall (Bechmann et al., 1981, Grosch et al., 1981). Man sollte weiterhin annehmen, dass Mutationen in den IVS vorausgehenden Exons α , β und γ , die ebenfalls einen Teil der vermeintlichen "Maturasas" kodieren, den gleichen Effekt auf die Reifung der mRNA haben wie Mutationen in IVS. Dies wurde nur für Exon α , nicht jedoch für β und γ gefunden (vgl. Abb.17).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Reihe von Befunden dafür sprechen, dass IVS α / β' , zusammen mit α , ein Protein kodiert, das an der Reifung der mRNA beteiligt ist und dass Mutationen in α und IVS α / β' entweder seine Expression verhindern oder zu einem defekten Produkt führen. Die Excision von IVS β / γ und IVS γ / δ scheint ebenfalls von mitochondrialen Genprodukten abzuhängen (vgl. Kap. 2.5 und weiter unten). Um welche Art von Produkten es sich dabei handelt und welche DNA-Sequenzen für diese kodieren, ist bisher unklar.

Wie im letzten Teil der vorliegenden Untersuchungen gezeigt wurde (Kap. 2.5), kann die Abhängigkeit der Excision von IVS α / β' , IVS β / γ und IVS γ / δ von einem oder mehreren mitochondrial synthetisierten Proteinen experimentell geprüft werden:

Chloramphenicol, ein spezifischer Hemmstoff der mitochondrialen Proteinsynthese, wurde wachsenden Zellen zugesetzt und die Wirkung fehlender mitochondrialer Translation an Hand der Muster der COB-Transkripte untersucht.

Nach kurzen Inkubationszeiten (1 Zellgeneration) wurde bereits eine Hemmung der "Processing"-Geschwindigkeit, erkennbar an einer Zunahme der mRNA-Vorstufen, beobachtet. Längere Einwirkungsdauer (3-5 Generationen) führte zur verstärkten Akkumulation der Vorstufen und schliesslich zu einem Transkriptmuster ähnlich dem der Mutanten der in Translationsrichtung ersten, vermutlich proteinkodierenden IVS α / β' des Stammes 777-3A. In einem Kontrollversuch mit einem CAP-resistenten Stamm (KL 14-4A) traten keine derartigen Wirkungen auf. Dies beweist, dass die Hemmung des Processing die Folge der Blockierung der mitochondrialen Proteinsynthese und nicht ein sekundärer, z.B. toxischer, Effekt des CAP ist. Damit darf die Abhängigkeit des Processing der COB-Transkripte von einem (oder mehreren) mitochondrial synthetisierten Protein(en) als erwiesen gelten.

Andere Autoren, insbesondere Slonimski und Mitarbeiter, haben eine Reihe indirekter Beweise angeführt, die eine Beteiligung des 42 KD-Proteins ("Maturase I"), kodiert in Exon α und IVS α / β' , am "Processing" sehr wahrscheinlich machen (s.o.) (Jacq et al., 1980; Lamoureux et al., 1980; Dujardin et al., 1980). Ist dieses 42 KD-Polypeptid das (oder eines der) nach CAP-Behandlung fehlende(n) Protein(e) ? Der Befund, dass - ähnlich den Mutationen in α und IVS α / β' - CAP zur Akkumulation von 32S-RNA führt, kann für diese Annahme sprechen. Folgt man dieser Hypothese, so muss man ein weiteres, mitochondrial synthetisiertes "Processing"-Enzym annehmen, da der Stamm D273-10B ebenfalls eine "Processing"-Hemmung nach Behandlung mit CAP zeigt, obwohl ihm die das 42 KD-Protein ("Maturase I") kodierende Sequenz IVS α / β' fehlt. D273-10B besitzt IVS γ / δ , die einen offenen Leserahmen enthält (ca. 1200 bp); diese könnte für ein weiteres "Processing"-Enzym ("Maturase III") kodieren (s.o.). Untersuchungen

zur Komplementation und Suppression von Mutationen in IVS γ/δ ($\hat{=}$ box 7; Dujardin et al., 1980) unterstützen durchaus die Annahme eines in IVS γ/δ kodierten Proteins.

Alternativ zur Annahme von zwei IVS-kodierten Proteinen ("Maturase I" in IVS α/β' , "Maturase III" in IVS γ/δ) ist die Möglichkeit eines ausserhalb der COB-Region kodierten mitochondrialen "Processing"-Enzyms zu diskutieren, das sowohl an der Excision von IVS α/β' und IVS β/γ (777-3A) als auch der von IVS γ/δ (D273-10B) beteiligt ist. Allerdings gibt es bisher keinerlei Hinweise auf ein solches mitochondriales Enzym, während die Existenz der "Maturase I" als sehr wahrscheinlich gilt, und die Existenz der "Maturase III" zumindest durch einige Befunde angedeutet wird. Der Hypothese, dass die Synthese dieser beiden "Maturasen" durch CAP blockiert wird, ist daher der Vorzug zu geben.

Zur Definition des "Primärtranskriptes" und zur Kodierungskapazität des mitochondrialen Genoms

Langzeitige Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese (5-10 Zellgenerationen) führte zu einem weiteren wichtigen Befund: 34S-RNA, die alle COB-Sequenzen einschliesslich der "leader"-Sequenz (900-1200 b; Grivell et al., 1980) enthält, ist offensichtlich nicht ein "primäres" Transkript, sondern ein durch "Processing" aus weitaus längeren RNAs (36S, 38S, 40S oder grösseren) entstandenes "sekundäres" Transkript. Hinweise auf einen derartigen Zusammenhang geben auch COB-Transkriptmuster einiger Mutanten von Exon α , die eine 38S-RNA-Spezies zusätzlich zu 32S- und 34S-RNA akkumulieren (Abb. 17). In welcher Richtung (5' oder 3') die RNA-Spezies von 36S bis 40S über die COB-Region hinausreichen, bleibt zu überprüfen, es ist jedoch auf Grund ihres hohen Molekulargewichts sehr wahrscheinlich, dass diese mehrere Gene umfassen. Eine Untersuchung dieser Frage könnte dazu beitragen, genauere Vorstellungen über mitochondriale Transkription, insbesondere über die Anzahl und

Positionen mitochondrialer Promotoren zu gewinnen (vgl. Levens et al., 1981; Borst und Grivell, 1981).

Das "frühe Processing" wird nur nach langzeitiger Hemmung durch CAP gestört. Dies deutet darauf hin, dass i) ein mitochondriales Enzymsystem beteiligt ist, das sich von dem des COB-"Processing" unterscheidet, und ii) dieses einen geringeren Turnover hat als die IVS-processierenden "Maturasen".

Die dargestellten Befunde machen deutlich, dass das mitochondriale Genom bei Hefe offensichtlich für mehr Proteine kodiert, als es bisher angenommen wurde (vgl. Einleitung); die zum Teil nur in sehr geringen Mengen gebildeten und kurzlebigen RNA-Processing-Enzyme sind dem direkten Nachweis bisher entgangen. Sequenzanalysen der mtDNA von Hefe, die inzwischen von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden, haben den Beweis erbracht, dass in den IVS oder zwischen den bisher bekannten Genorten offene Leserahmen existieren, also Bereiche, die auf Grund ihrer Sequenz für ein Protein kodieren können. Diese kommen nicht nur in COB-IVS vor (Lazowska et al., 1980; Nobrega und Tzagoloff, 1980), sondern auch in IVS der OXI 3-Region (Bonitz et al., 1980) und des Gens für 21S-rRNA (Dujon, 1980) sowie in Bereichen nahe der OLI 2-Region und zwischen OXI 1 und OXI 2 (Hensgens, persönliche Mitteilung - zitiert in: Borst und Grivell, 1981). Neueste Arbeiten einer anderen Arbeitsgruppe (Anderson et al., 1981), die die komplette Sequenz des mitochondrialen Genoms von HeLa-Zellen wiedergeben, zeigen auch dort einige offene Leserahmen. Ob - und wenn ja, in welchem Ausmass - diese transkribiert und translatiert werden und welche Funktionen ihnen zukommen (RNA-"Processing", ribosomale Proteine, Regulationsenzyme ?) ist eine bisher kaum beantwortete Frage.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Eine genetisch/physikalische Feinstrukturkarte der COB-Region in mtDNA von *Saccharomyces cerevisiae*, die für Apocytochrom b kodiert und mosaik ist, wurde erstellt. Sie beinhaltet die Schnittstellen für die Restriktionsendonucleasen AluI, BamHI, EcoRI, HaeIII, HpaII, HindII und HindIII. Restriktionsanalysen von ρ^- -Stämmen, die verschiedene, sich überlappende Sequenzen der mtDNA dieser Region zurückbehalten hatten und deren genetische Marker bekannt waren, erlaubten die Längenbestimmung der gesamten COB-Region sowie Angaben über Anzahl, Positionen und Längen von kodierenden und intervenierenden Bereichen. Die Kombination der physikalischen Karte mit den genetischen Daten der ρ^- -Stämme ergab: i) COB-Mutationen erstrecken sich über eine Länge von 8400 bp, ii) Mutationen in kodierenden Bereichen lassen sich fünf definierten Regionen zuordnen, die durch IVS voneinander getrennt sind, iii) die Maximallängen der kodierenden Bereiche sind 1200-1500 bp (α), < 200 bp (β), 700 bp (γ), < 200 bp (δ) und 1000 bp (ϵ), iii) die Minimallängen der IVS betragen 1900 bp (IVS α/β), 1400 bp (IVS β/γ), 1400 bp (IVS γ/δ) und 350 bp (IVS δ/ϵ).

Der Hauptteil der Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Reifungsprozesse von Transkripten der COB-Region an Hand von Hybridisierungsstudien mit mtRNA des Wildtyps und cob^- -Mutanten. Die Anwendung von ^{32}P -mtDNA-Proben mit definierten Teilsequenzen der COB-Region erlaubte die Untersuchung der Zusammensetzung der mRNA-Zwischenstufen. Die Ergebnisse zeigen, dass i) der funktionelle Messenger für Apocytochrom b eine 18S-RNA ist, ii) zur Formation dieses Messengers IVS aus dem primären Transkript in insgesamt mindestens fünf Excisionsschritten entfernt werden, und iii) keine absolute Reihenfolge in der Excision einzelner IVS besteht, wie das Transkriptmuster von mRNA des Wildtyps erkennen lässt. Jedoch ergibt sich auf Grund der unterschiedlichen

Excisionskinetiken der einzelnen IVS eine bevorzugte Reihenfolge an Reifungsschritten.

Die Untersuchung der Auswirkung von Mutationen in vier der fünf IVS ergab, dass i) sie eine Blockierung des "Processing" bewirken und zur Akkumulation von mRNA-Vorstufen führen, und ii) sie entweder nur die Excision der IVS blockieren, in der die Mutation liegt, es im Gegensatz dazu aber auch in drei IVS Mutationen gibt, die die Excision weiterer IVS verhindern, wobei polare Effekte zu beobachten sind.

Um die einzelnen Befunde in Einklang zu bringen, werden - zusammen mit den Arbeiten anderer Autoren - Hypothesen diskutiert, die davon ausgehen, dass in IVS kodierte Produkte in geringen Mengen an COB-mRNA-Vorstufen synthetisiert werden und für das "Processing" der COB-Transkripte notwendig sind.

Der Beweis, dass eines oder mehrere mitochondrial synthetisierte Proteine am RNA-"Processing" beteiligt sind, konnte durch Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese mit Chloramphenicol erbracht werden: In Abhängigkeit von der CAP-Einwirkungsdauer auf wachsende Zellen erfolgte eine Blockierung des "Processing" auf unterschiedlichen Stufen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erlaubten ebenfalls erste Aussagen über Vorgänge, die die mitochondriale Transkription betreffen: In Gegenwart von CAP werden mRNA-Vorstufen akkumuliert, von denen man auf Grund ihres Molekulargewichtes annehmen muss, dass sie mehr als 1 Gen enthalten, eine Transkriptionseinheit (das "Primärtranskript") somit vermutlich aus mehreren, benachbarten Genen besteht.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Alexander, N.J., Vincent, R.D., Perlman, P.S.: Genetic and biochemical analyses of the COB region in *S. cerevisiae*. In: 9th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Rochester, 30 (1978)
- Alexander, N.J., Vincent, R.D., Perlman, P.S., Miller, D.H., Hanson, D.K. and Mahler, H.R.: Regulatory interaction between mitochondrial genes. *J. Biol. Chem.* 254, 2471-2479 (1979)
- Alexander, N.J., Perlman, P.S., Hanson, D.K. and Mahler, H.R.: Mosaic organization of a mitochondrial gene - evidence from double mutants in the cytochrome b region of *S. cerevisiae*. *Cell* 20, 199-206 (1980)
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., Stark, G.R.: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyl-oxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5350-5354 (1977)
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. and Young, I.G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465 (1981)
- Bailey, J.M. and Davidson, N.: Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 70, 75-85 (1976)
- Bechmann, H., Haid, A., Schweyen, R.J., Mathews, S. and Kaudewitz, F.: Expression of the split gene COB in yeast mtDNA - Translation of intervening sequences in mutant strains. *J. Biol. Chem.*, in press (1981)
- Böker, E., Kaudewitz, F., Richmond, K.V., Schweyen, R.J. and Thomas, D.Y.: The effect of glucose on the number of mitochondrial genomes participating in mitochondrial crosses. In: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Thomas, D.Y., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Berlin: De Gruyter, 99-115 (1976)
- Bonitz, S.G., Coruzzi, G., Thalenfeld, B.E., Tzagoloff, A. and Macino, G.: Assembly of the mitochondrial membrane system: Structure and nucleotide sequence of the gene coding for subunit I of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 255, 11927-11941 (1980)

- Borst, P.: Mitochondrial nucleic acids. *Ann.Rev.Biochem.* 41, 333-376 (1972)
- Borst, P. and Grivell, L. A.: The mitochondrial genome of yeast. *Cell* 15, 705-723 (1978)
- Borst, P. and Grivell, L. A.: Small is beautiful - portrait of a mitochondrial genome. *Nature* 290, 443-444 (1981)
- Church, G. M., Slonimski, P. P. and Gilbert, W.: Pleiotropic mutations within two yeast mitochondrial cytochrome genes block mRNA processing. *Cell* 18, 1209-1215 (1979)
- Church, G. M. and Gilbert, W.: Yeast mitochondrial intron products required in trans for RNA splicing. In: Mobilization and reassembly of genetic information (Joseph, D. R., Schultz, J., Scott, W. A. and Werner, R., eds.) Academic Press, New York (1980)
- Crick, F.: Split genes and RNA splicing. *Science* 204, 264-271 (1979)
- De Kochko, A., Colson, A. M. and Slonimski, P. P. *Arch.Int. Physiol.Biochem.* 87, 619-620 (1979)
- Denhardt, D. T.: A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 23, 641-646 (1966)
- Dujardin, G., Groudinsky, O., Kruszevska, A., Pajot, P., and Slonimski, P. P.: Cytochrome b messenger RNA maturase encoded in an intron regulates the expression of the split gene. III. Genetic and phenotypic suppression of intron mutations. In: The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome (Kroon, A. M. and Saccone, C., eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 157-160 (1980)
- Dujon, B.: Sequence of the introns and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNA gene of yeast strains having different alleles at the *w* and *rib-1* loci. *Cell* 20, 185-197 (1980)
- Faye, G., Fukuhara, H., Grandchamp, C., Laskowska, J., Michel, F., Casney, I., Getz, G. S., Locker, J., Rabinowitz, M., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P. and Slonimski, P. P.: Mitochondrial nucleic acids in petite colonie mutants: Deletion and repetition of genes. *Biochimie* 55, 779-792 (1973)

- Fukuhara, H., Bolotin-Fukuhara, M., Hsu, H. J., Rabinowitz, M.: Deletion mapping of mitochondrial tRNA genes in *S. cerevisiae* by means of cytoplasmic petite mutants. *Molec. Gen. Genet.* 145, 7-17 (1976)
- Gilbert, W.: Why genes in pieces ? *Nature* 271, 501 (1978)
- Glover, D. M. and Hogness, D. S. *Cell* 10, 167-176 (1977)
- Goodman, H. M., Olson, M. V. and Hall, B. D.: Nucleotide sequence of a mutant eukaryotic gene: The yeast tyrosine-inserting ochre suppressor SUP4-0. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5453-5461 (1977)
- Grivell, L. A., Reijnders, L. and DeVries, H.: Altered mitochondrial ribosomes in a cytoplasmic mutant of yeast. *FEBS letters* 16, 159-163 (1971)
- Grivell, L. A., Arnberg, A. C., Boer, P. H., Borst, P., Bos, J. L., Van Bruggen, E. F. J., Groot, G. S. P., Hecht, N. B., Hensgens, L. A. M., Van Ommen, G. J. B. and Tabak, H. F.: Transcripts of yeast mitochondrial DNA and their processing. In: *Extrachromosomal DNA. ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology* (Cummings, D., Borst, P., Dawid, I. B., Weissman, S. and Fox, C. F., eds.) 15, Academic Press New York, 305-324 (1979)
- Grivell, L. A., Arnberg, A. C., Hensgens, L. A. M., Roosendaal, E., Van Ommen, G. J. B. and Van Bruggen, E. F. J.: Split genes on yeast mitochondrial DNA: Organization and expression. In: *The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome* (Kroon, A. M. and Saccone, C., eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 37-49 (1980)
- Groot, G. S. P., Flavell, R. A., Van Ommen, G. J. B. and Grivell, L. A.: Yeast mitochondrial RNA does not contain poly(A). *Nature* 252, 167-169 (1974)
- Grosch, G., Schmelzer, C. and Mathews, S.: Physical map of the COB region in mitochondrial DNA of *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* 3, 65-71 (1981)
- Haid, A., Grosch, G., Schmelzer, C., Schweyen, R. J. and Kaudewitz, F.: Expression of the split gene COB in yeast mtDNA - Mutational arrest in the pathway of transcript splicing. *Curr. Genet.* 1, 155-161 (1980)
- Halbreich, A., Pajot, P., Foucher, M., Grandchamp, C. and Slonimski, P. P.: A pathway of cytochrome b mRNA processing in yeast mitochondria: specific splicing steps and an intron-derived circular RNA. *Cell* 19, 321-329 (1980)

- Hanson, D. K., Miller, D. H., Mahler, H. R., Alexander, N. J. and Perlman, P. S.: Regulatory interactions between mitochondrial genes. II. Detailed characterization of novel mutants mapping within one cluster in the COB 2 region. *J. Biol. Chem.* 254, 2480-2490 (1979)
- Hendler, F., Padmanaban, G., Patzer, J., Ryan, R. and Rabinowitz, M.: Yeast mitochondrial RNA contains short poly(A) segment. *Nature* 258, 357-359 (1975)
- Henikoff, S.: Ph.D. Thesis, Harvard University (1977)
- Heyting, C., Meijlink, F. C. P. W., Verbeet, M. P., Sanders, J. P. M. and Borst, P.: Fine structure of the 21S ribosomal RNA region on yeast mitochondrial DNA. I. Construction of the physical map and localization of the cistron for the 21S mitochondrial ribosomal RNA. *Molec. Gen. Genet.* 168, 231-250 (1979)
- Holzer, H.: Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 1, 178-180 (1976)
- Ingolia, T. D., Craig, E. A. and Brian, J. M.: Sequence of three copies of the gene for the major drosophila heat shock induced protein and their flanking regions. *Cell* 21, 669-679 (1980)
- 10th International Bari Conference on the Genetic Function of Mitochondrial DNA. In: *The Genetic Function of Mitochondrial DNA* (Saccone, C. and Kroon, A. M., eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1976)
- 12th International Bari Conference on the Organization and Expression of the Mitochondrial Genome. In: *The Organization and Expression of the mitochondrial Genome* (Kroon, A. M. and Saccone, C., eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1980)
- Jacq, C., Lazowska, J. and Slonimski, P. P.: Sur un nouveau mécanisme de la régulation de l'expression génétique. *C. R. Acad. Sc. Paris* 290, Serie D, 89-92 (1980)
- Jackson, E. N., Miller, H. J. and Adams, M. C.: EcoRI restriction endonuclease cleavage site map of bacteriophage p22 DNA. *J. Mol. Biol.* 118, 347-363 (1978)
- Kotylak, Z. and Slonimski, P. P.: Joint control of cytochrome a and b by a unique mitochondrial DNA region comprising four genetic loci. In: *The Genetic Function of Mitochondrial DNA* (Saccone, C. and Kroon, A. M., eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press 143-154 (1976)

- Kotylak, Z. and Slonimski, P.P.: Fine structure genetic map of the mitochondrial DNA region controlling coenzyme QH₂: cytochrome c reductase. In: Mitochondria 77 - Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds) Berlin: de Gruyter 161-172 (1977)
- Kozak, M.: Influence of mRNA secondary structure on binding of 40S ribosomal subunits. *Cell* 19, 79-90 (1980)
- Kreike, J., Bechmann, H., Van Hemmert, F.J., Schweyen, R.J., Boer, P.H., Kaudewitz, F. and Groot, G.S.P.: The identification of apocytochrome b as a mitochondrial gene product and immunological evidence for altered apocytochrom b in yeast strains having mutations in the COB region of mitochondrial DNA. *Eur. J. Biochem.* 101, 607-617 (1979)
- Lamoureux, A., Pajot, P., Kochko, P., Halbreich, A. and Slonimski, P.P.: Cytochrome b messenger RNA maturase encoded in an intron regulates the expression of the split gene: II. Trans- and cis-acting mechanism of mRNA splicing. In: The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome (Kroon, A.M. and Saccone, C., eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 153-156 (1980)
- Lang, B., Burger, G., Doxiadis, I., Thomas, D.Y., Bandlow, W. and Kaudewitz, F.: A simple method for the large scale preparation of mitochondria from microorganisms. *Anal. Biochem.* 77, 110-121 (1977)
- Lazowska, J., Jacq, C. and Slonimski, P.P.: DNA sequence and organization of the cyt. b gene. *Cell* 22, 333-348 (1980)
- Lehrach, H., Diamond, D., Worney, J.M. and Boedtker, H.: RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-4751 (1977)
- Lerner, M.R., Boyle, J.A., Mount, S.M., Wolin, S.L. and Steitz J.A.: Are snRNAs involved in splicing ? *Nature* 283, 220-224 (1980)
- Lewin, A., Morimoto, R. and Rabinowitz, M.: Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs of petite mutants of yeast: Classification of petites, and deletion mapping of mitochondrial genes. *Molec. Gen. Genet.* 163, 257-275 (1978)
- Levens, D., Morimoto, R. and Rabinowitz, M.: Mitochondrial transcription complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256, 1466-1473 (1981)
- Locker, J., Rabinowitz, M. and Getz, G.S.: Tandem inverted repeats in mitochondrial DNA of petite mutants of *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1366-1370 (1974a)

- Locker, J., Rabinowitz, M. and Getz, G.S.: Electron microscopic and renaturation kinetic analysis of mitochondrial DNA of cytoplasmic petite mutants of *S. cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 88, 489-507 (1974b)
- Mahler, H.R., Hanson, D., Lin, D.D., Alexander, N.J., Vincent, R.D. and Perlman, P.S.: In: *Biochemistry and Genetics of Yeast: Pure and Applied Aspects* (Bacila, H., Horecker, B.L. and Stoppani, A.O.M., eds.) Academic Press, New York, 513-547 (1978)
- Minty, A. and Newmark, P.: Gene regulation: new, old and remote controls. *Nature* 288, 210-211 (1980)
- Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter (1977)
- Morimoto, R., Lewin, A. and Rabinowitz, M.: Physical mapping and characterization of the mitochondrial DNA and RNA sequences from mit⁻ mutants defective in cytochrome oxidase peptide 1 (OXI 3). *Molec. Gen. Genet.* 170, 1-9 (1979)
- Morimoto, R., Merten, S., Lewin, A., Martin, N.C. and Rabinowitz, M.: Physical mapping of genes on yeast mitochondrial DNA: Localization of antibiotic resistance loci, and rRNA and tRNA genes. *Molec. Gen. Genet.* 163, 241-255 (1978)
- Müller, W. and Gautier, F.: Interactions of heterochromatic compounds with nucleic acids AT-specific non intercalating DNA ligands. *Eur. J. Biochem.* 54, 385-394 (1975)
- Murray, V. and Holliday, R.: Mechanism for RNA-splicing of gene transcripts. *FEBS letters* 106, 5-7 (1979)
- Nobrega, F.G. and Tzagoloff, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system: Structure and localization of the mitochondrial glutamic tRNA gene in *S. cerevisiae*. *FEBS letters* 113, 52-54 (1980)
- Pajot, M., Wambier-Kluppel, M.L., Kotylak, Z. and Slonimski, P.: Regulation of cytochrome oxidase formation by mutants in a mitochondrial gene for cytochrome b. In: *Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria* (Bücher, Th., Neupert, W., Sebald, W. and Werner, S., eds.) North-Holland, Amsterdam, 443-451 (1976)
- Peacock, A.C. and Dingman, C.W.: Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamid gel electrophoresis. *Biochemistry* 6, 1818-1827 (1967)

- Prunell, A. and Bernardi, G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells VI. Genome organization. *J. Mol. Biol.* 110, 53-74 (1977)
- Rigby, P. W., Dieckman, M., Rhodes, C. and Berg, P.: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251 (1977)
- Sanders, J. P. M., Heyting, C. and Borst, P.: The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. I. The genes for large and small ribosomal RNA are far apart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 699-707 (1975)
- Sanders, J. P. M., Heyting, C., Verbeet, M. P. H., Meijlink, F. C. P. W., and Borst, P.: The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. III. Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNAs from three wild-type *Saccharomyces* strains. *Molec. Gen. Genet.* 157, 239-261 (1977)
- Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Fiddes, I. C., Hutchison III, C. A., Slocumbe, P. M. and Smith, M. J.: The nucleotide sequence of bacteriophage ϕX 174. *J. Mol. Biol.* 125, 225-246 (1978)
- Schatz, G. and Mason, T. L.: The biosynthesis of mitochondrial proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 51-87 (1974)
- Schweyen, R. J., Weiss - Brummer, B., Backhaus, B. and Kaudewitz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome including the fine structure of COB and OXI clusters. In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W., Schweyen, R. J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter, 139-149 (1977)
- Schweyen, R. J., Weiss - Brummer, B., Backhaus, B. and Kudewitz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome in yeast. Map positions of drug^r and mit⁻ markers as revealed from population analysis of rho⁻ clones in *S. cerevisiae*. *Molec. Gen. Genet.* 159, 151-160 (1978)
- Sherman, F., Steward, J. W., Parker, J. H., Inhaber, E., Shipman, N. A., Putterman, G. J., Gardinsky, R. L. and Margoliash, E.: The mutational alteration of the primary structure of yeast Iso-I-cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 107, 5446-5456 (1968)
- Slonimski, P. P. and Tzagoloff, A.: Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH₂-cytochrome-c-reductase. *Eur. J. Biochem.* 61, 27-41 (1976)

- Slonimski, P. P., Pajot, P., Jacq, C., Foucher, M., Perrodin, G., Kochko, A. and Lamouroux, A.: Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome -c-reductase and oxidase. I. Genetic, physical and complementation maps of the box region. In: *Biochemistry and Genetics of Yeast: Pure and Applied Aspects* (Bacila, M., Horecker, B. L., Stoppani, A. O. M., eds.) New York, Academic Press, 339-368 (1978a)
- Slonimski, P. P., Claisse, M. L., Foucher, M., Jacq, C., Kochko, A., Lamouroux, A., Pajot, P., Perrodin, G., Spyridakis, A., and Wambier-Kluppel, M. L.: Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome-c-reductase and oxidase. III. A model of structure and function. In: *Biochemistry and Genetics of Yeast: Pure and Applied Aspects* (Bacila, M., Horecker, B. L., Stoppani, A. O. M., eds.) New York, Academic Press, 391-401 (1978b)
- Solioz, M. and Schatz, G.: Mutations in putative intervening sequences of the mitochondrial cytochrome b gene of yeast produce abnormal cytochrome b polypeptides. *J. Biol. Chem.* 254, 9331-9334 (1979)
- Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517 (1975)
- Tabak, H. F., Hecht, N. B., Menke, H. H. and Hollenberg, C. P.: The gene for the small ribosomal RNA on yeast mitochondrial DNA: physical map, direction of transcription and absence of an intervening sequence. *Curr. Genet.* 1, 33-43 (1979)
- Tzagoloff, A., Bonitz, S. G., Coruzzi, G. and Thalenfeld, B. E.: Yeast mitochondrial cytochrome oxidase genes. In: *The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome* (Kronn, A. M. and Saccone, C., eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 181-190 (1980)
- Valenzuela, P., Venegas, A., Weinberg, F., Bishop, R. and Rutter, W. J.: Structure of phenylalanine-tRNA genes: An intervening DNA segment within the region coding for the tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 190-194 (1978)
- Van Ommen, G. J. B. and Groot, G. S. P.: A transcription map of yeast mitochondrial DNA. In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W., Schweyen, R. J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter, 415-424 (1977)

- Van Ommen, G. J. B., Groot, G. S. P. and Grivell, L. A.:
Transcription maps of mtDNAs of two strains of
Saccharomyces: Transcription of strain-specific
insertions; complex RNA maturation and splicing.
Cell 18, 511-523 (1979)
- Van Ommen, G. J. B., Boer, P. H., Groot, G. S. P., Haan, M.,
Haid, A., Rosendahl, E., Schweyen, R. J. and Grivell, L. A.:
Mutations affecting RNA splicing and the interaction
of gene expression of the yeast mitochondrial loci
COB and OXI 3. *Cell* 20, 173-183 (1980)
- Wolf, K., Dujon, B. and Slonimski, P. P.: Mitochondrial genetics.
V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a
mutation conferring paromomycin resistance in *Saccharo-*
myces cerevisiae. *Molec. Gen. Genet.* 125, 53-90 (1973)
- Zimmermann, S. B. and Sandeen, G. *Anal. Biochem.* 14, 269-277
(1966)

Am Schluss dieser Arbeit möchte ich all jenen danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. R.J.Schweyen für die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen und seine Diskussionsbereitschaft, sowie der Bereitstellung von Mutanten, Herrn Dr. A.Haid und Frau Dr. G.Grosch ebenfalls für zahlreiche Diskussionen, Frau Dr. G.Grosch ferner für die praktische Einführung in die Methode des "Northern-Blots" und für die Überlassung einiger Restriktionsdaten.

Ausserdem möchte ich mich bei Frl. Salima Mathews und Herrn Roland Guba für ihre hilfreichen Hinweise, die genetische Fragestellungen betrafen, bedanken, sowie bei Herrn Dr. Schmieger für Bereitstellung von P22-DNA zur Molekulargewichtsbestimmung. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frl. K.Watzinger für die gewissenhafte Durchführung eines grossen Teils der RNA-Präparationen bedanken.

Mein weiterer Dank gilt ausserdem vielen Mitarbeitern des Instituts für nützliche Diskussionen, Kooperationsbereitschaft und der Verfügungstellung einzelner Proben.

Ein grosser Teil der für diese Arbeit erforderlichen Untersuchungen wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk finanziert.

Lebenslauf

1949	geboren am 16.4. in Eberbach/Neckar
1955-1958	Volksschule Rockenau
1959-1968	Gymnasium Eberbach, Abitur: 1968
1971-1978	Universität München, Vordiplom: 1973
1974-1975	Mitarbeiter der Studiengruppe für Biologie und Umwelt, München, Priv.Do. Dr. F. Vester
1977	Diplomprüfung
1977-1978	Diplomarbeit an der medizinischen Fakultät der Universität München, Institut für physiologische Chemie und Biochemie, Priv.Do. Dr. H. Feldmann
1979	Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof. Dr. R. J. Schweyen

